



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia  
Ano 2009

**Sandra Sofia da Silva  
Ferreira Rebelo**

**Estudo por Citogenética Convencional e FISH de  
50 amostras com LLC-B**



**Sandra Sofia da Silva  
Ferreira Rebelo**

**Estudo por Citogenética Convencional e FISH de 50  
amostras com LLC-B**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Lima Viseu Carvalho Pinto Leite, Responsável do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, e co-orientação científica do Doutor António Carlos Matias Correia, Professor associado com agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

Trabalho realizado no âmbito do  
projecto de investigação Nº 6/2007  
do Ministério da Saúde - Comissão  
de Fomento de Investigação em  
Cuidados de Saúde

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

professora associada com agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

**Doutora Maria do Rosário Lima Viseu Carvalho Pinto Leite (Orientadora)**

responsável do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Prof. Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas**

professor associado, investigador do Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia - Centro de Genética e Biotecnologia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Escola das Ciências da Vida e do Ambiente

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia (Co-orientador)**

professor associado com agregação do Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e encorajamento de algumas pessoas, que merecem o meu sincero agradecimento.

À Excelentíssima Senhora Doutora Eufémia Ribeiro, Directora do Serviço de Genética do Centro de Diagnóstico Pré-Natal, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, E. P. E. agradeço a possibilidade de realização deste Mestrado, disponibilizando os meios e infra-estruturas do Serviço.

À minha orientadora externa de Mestrado, Excelentíssima Senhora Doutora Rosário Pinto Leite, responsável pelo Laboratório de Citogenética, agradeço a orientação prestada, disponibilidade e ajuda constantes e a leitura crítica e sugestiva da Tese de Mestrado.

Ao meu orientador interno de estágio, Excelentíssimo Senhor Doutor António Correia, agradeço todo o apoio e incentivo prestados.

Aos Excelentíssimos Doutora Marta Souto e Doutor Pedro Botelho, assistentes do Laboratório de Citogenética, agradeço todo o companheirismo, amizade e permanente disponibilidade em ensinar e ajudar.

A todos os membros do Serviço de Genética, agradeço o apoio, solidariedade e amizade que me proporcionaram.

Aos meus pais que ao longo de toda a formação académica me incentivaram, apoiaram e auxiliaram, permitindo-me alcançar esta etapa.

Aos meus amigos, por todo o carinho, encorajamento e ajuda prestados.

A todos o meu sincero OBRIGADA!

## palavras-chave

leucemia linfocítica crónica do tipo B, linfócitos B, marcadores celulares, mitogéneos, alterações genéticas, FISH

## resumo

A leucemia linfocítica crónica do tipo B (LLC-B) é a forma de leucemia mais comum nos adultos do hemisfério Ocidental e, apesar de afectar sobretudo indivíduos idosos, cerca de um quinto dos pacientes tem menos de 55 anos quando diagnosticada. Esta patologia segue um decurso clínico variável com taxas de sobrevivência que se estendem de meses a décadas.

Tem-se verificado uma evolução crescente no conhecimento e compreensão das doenças linfoproliferativas crónicas durante os últimos 30 anos, recorrendo a métodos citogenéticos, moleculares e imunológicos. Até ao final dos anos 70, as alterações cromossómicas eram estudadas por culturas de curta duração *in vitro* e análise das metafases. Contudo, devido ao baixo índice mitótico espontâneo das células tumorais, não foi possível identificar anomalias associadas à LLC-B através deste método, visto que se obtinham metafases de baixa qualidade e em escassa quantidade. Na década de 80 alguns mitogéneos como TPA, lipopolissacarídeos e *pokeweed* começaram a ser aplicados para estimulação das células B, permitindo identificar as alterações genéticas recorrentes desta patologia. O presente trabalho teve como objectivo identificar, em cinquenta amostras de sangue periférico com LLC-B diagnosticada, as alterações cromossómicas associadas à doença que estão documentadas na literatura e determinação da existência de novas alterações recorrentes, através da aplicação de técnicas citogenéticas e moleculares (*Fluorescence in situ Hybridization* (FISH)).

Relativamente aos resultados citogenéticos deste trabalho, foi possível estimular o crescimento celular na totalidade das amostras, obtendo-se preparações cromossómicas com tamanho e resolução de bandas desejável para análise e em 66% dos casos foram detectadas anomalias cromossómicas. A deleção do cromossoma 13q14 foi a alteração cromossómica mais frequente, seguida da trissomia do cromossoma 12, e da deleção do *locus* 17p13. Foram identificadas outras mutações pouco comuns, nomeadamente translocações equilibradas em 8% das amostras e, quando presentes envolviam, normalmente, o cromossoma 14q.

Relativamente à deleção dos *loci* 13q14 e 17p13 e trissomia do cromossoma 12, procedeu-se à sua pesquisa por FISH, permitindo a sua identificação em 54% das amostras. Os resultados citogenéticos foram confirmados pela técnica molecular, e em um caso em concreto, a FISH permitiu a detecção de uma deleção subtil do cromossoma 13q14 imperceptível por métodos clássicos.

## keywords

b-cell chronic lymphocytic leukaemia, B lymphocytes, mitogens, genetic abnormalities, FISH

## abstract

B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL) is the most common form of adult leukaemia in the Western hemisphere and, although it mainly affects the elderly, about one fifth of the patients are less than 55 years old at diagnosis. This pathology follows a variable clinical course with overall survival times ranging from months to decades.

Over the past 30 years there has been an increasing evolution in the knowledge and understanding of chronic lymphoproliferative disorders, based on cytogenetic, molecular and immunological methods. Until the late 1970s, chromosome alterations were studied by conventional short-term *in vitro* cultures and chromosome analysis. Nevertheless, due to the low *in vitro* mitotic activity of the tumour cells, it was unable to identify genetic abnormalities associated to B-CLL through this method, once it led to poor quantity and quality of metaphase spreads. In the 1980s some mitogens, such as TPA, lipopolysaccharides and pokeweed, began being applied to stimulate B cells so they could proliferate *in vitro* and led to the identification of recurrent genetic alterations in B-CLL. The present work's purpose consisted in identifying, in fifty peripheral blood samples diagnosed with B-CLL, the chromosomal alterations documented in literature associated to this disease, and determining the existence of new recurrent alterations through cytogenetic and molecular (*Fluorescence in situ Hybridization* (FISH)) methods.

Relatively to the cytogenetic results within this document, the cellular mitotic activity was induced in every sample, permitting to generate metaphase spreads with suitable size and bands resolution for analysis, and in 66% of the cases chromosomal anomalies were detected. Deletion of chromosome 13q14 was the most frequent chromosomal aberration, followed by trisomy of chromosome 12 and deletion of the *locus* 17p13. Other unusual mutations were identified, namely balanced translocations in 8% of the cases and, when they were present, they usually involved the chromosome 14q.

In what concerns to the deletion of the *loci* 13q14, 17p13 and trisomy of 12 FISH was performed, allowing their identification in 54% of the samples. The cytogenetic results were confirmed by the molecular technique, and specifically in one case, FISH permitted the detection of a subtle deletion of chromosome 13q14 which was imperceptible by conventional methods.

**Índice**

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1. APOIO DA CITOGENÉTICA AO CANCRO HEMATOLÓGICO .....	1
2. FISH E SUA APLICAÇÃO NA HEMATOLOGIA .....	2
2.1. Perspectiva histórica.....	3
2.2. Tipos de sonda .....	4
2.3. Factores condicionantes.....	6
2.4. Poder de resolução.....	6
2.5. FISH <i>versus</i> Citogenética convencional.....	7
3. LEUCEMIAS.....	7
3.1. Introdução.....	7
3.2. Perspectiva histórica.....	8
3.3. Classificação das leucemias e incidências.....	9
3.4. Leucemia Linfocítica Crónica do tipo B (LLC-B).....	10
3.4.1. Linfócitos B .....	10
3.4.1.1. Maturação dos linfócitos B.....	11
3.4.1.2. Receptor das células B.....	20
3.4.1.3. Diferenciação das células B .....	21
3.4.2. Perspectiva histórica da LLC.....	23
3.4.3. Incidências e variantes da LLC .....	25
3.4.4. Aspectos clínicos e imunofenótipo da LLC-B .....	25
3.4.5. Estádios da LLC-B .....	26
3.4.6. LLC-B atípica .....	28
3.4.7. Factores de risco .....	29
3.4.8. Patogénese.....	29
3.4.9. Anomalias genéticas da LLC-B .....	31
3.4.9.1. Delecção do 13q14.....	33
3.4.9.2. Delecção do 11q22-q23.....	35
3.4.9.3. Trissomia do cromossoma 12.....	36
3.4.9.4. Delecção do 6q21.....	38

3.4.9.5. Delecção do 17p13.....	39
3.4.9.6. Rearranjos do 14q32.....	40
3.4.9.7. Outras anomalias .....	42
3.4.10. Estado da mutação dos genes para V <sub>H</sub> e sobrevivência/alterações cromossómicas .....	43
3.4.11. Estado de mutação dos genes para V <sub>H</sub> e CD38 .....	44
3.4.12. ZAP-70 .....	45
3.4.13. Diagnóstico da LLC-B.....	46
3.4.14. Tratamento da LLC-B.....	46
3.4.14.1. Quimioterapia.....	48
3.4.14.2. Radioterapia.....	49
3.4.14.3. Imunoterapia .....	49
3.4.14.4. Transplante de células hematopoiéticas.....	50
<b>OBJECTIVOS .....</b>	<b>52</b>
<b>MATERIAL.....</b>	<b>53</b>
<b>MÉTODOS .....</b>	<b>54</b>
⇒ Citogenética Convencional.....	54
1. CULTURA CELULAR.....	54
2. MANIPULAÇÃO .....	55
2.1. Colcemide.....	56
2.2. Solução salina .....	56
2.3. Fixador .....	57
3. ESPALHAMENTO.....	57
4. BANDEAMENTO .....	58
5. OBSERVAÇÃO E ANÁLISE DE METAFASES COM MONTAGEM DO CARIOGRAMA .....	58
⇒ FISH.....	59
1. A TÉCNICA .....	59
1.1. Preparação das lâminas .....	59
1.2. Preparação da sonda .....	60
1.3. Desnaturação da sonda e cromossomas.....	61



1.4.	Hibridização da sonda com o <i>locus</i> em estudo .....	61
1.5.	Lavagem pós-hibridização .....	61
1.6.	Contraste dos cromossomas .....	62
1.7.	Análise microscópica .....	62
<b>REGISTO DE RESULTADOS .....</b>		<b>63</b>
⇒	Citogenética Convencional.....	63
⇒	FISH.....	76
<b>DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....</b>		<b>83</b>
⇒	Citogenética Convencional.....	83
⇒	FISH.....	87
<b>CONCLUSÃO .....</b>		<b>91</b>
<b>PROJECCÃO DO PROJECTO .....</b>		<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>		<b>94</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>I</b>

### **Índice de figuras**

Figura 1 – Diagrama representativo da hematopoiese, salientando as duas vias possíveis e respectivas células formadas (adaptado de [34]) .....	12
Figura 2 – Diagrama representativo da sequência de eventos e características dos estádios de maturação das células B (adaptado de [34]) .....	14
Figura 3 – Esquema representativo da estrutura de uma imunoglobulina (adaptado de [34]) .....	15
Figura 4 – Representação esquemática dos segmentos genéticos para a cadeia pesada das imunoglobulinas, situados no cromossoma 14 (adaptado de [35]) .....	17
Figura 5 – Representação esquemática dos segmentos genéticos para a cadeia leve do isotipo $\lambda$ das imunoglobulinas, situados no cromossoma 22 (adaptado de [35]) .....	18

Figura 6 – Esquema representativo da estrutura de um receptor funcional das células B (adaptado de [34]) .....	20
Figura 7 – Representação esquemática de um folículo linfóide secundário, com centros germinativos (adaptado de [34]) .....	22
Figura 8 – Ideograma do cromossoma 13, com a seta evidenciando a banda q14 (adaptado de [91]) .....	33
Figura 9 – Ideograma do cromossoma 11, com a chaveta evidenciando a região q22-23 (adaptado de [92]) .....	35
Figura 10 – Ideograma do cromossoma 12, com a chaveta evidenciando a região q13-q21.2 (adaptado de [92]).....	37
Figura 11 – Ideograma do cromossoma 6, com a seta evidenciando a região q21 (adaptado de [91]) .....	38
Figura 12 – Ideograma do cromossoma 17, com a seta evidenciando a região para o gene p53 (adaptado de [91]).....	39
Figura 13 – Ideograma do cromossoma 14, com a seta evidenciando a banda q32 (adaptado de [91]) .....	41
Figura 14 – Representação esquemática da estrutura do gene BCL2, evidenciando a localização das regiões mbr e mcr (adaptado de [55]) .....	42
Figura 15 - Cariograma da amostra 15 obtido por cultura com PHA-M (protocolo D).....	64
Figura 16 - Cariograma da amostra 29, com trissomia do cromossoma 12, obtido por cultura com LPS (protocolo L).....	65
Figura 17 - Cariograma da amostra 5 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia a deleção da banda q14 do cromossoma 13.....	68
Figura 18 - Cariograma da amostra 23 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia trissomia do cromossoma 12 .....	69
Figura 19 - Cariograma da amostra 41 obtido por cultura com <i>pokeweed</i> (protocolo C). A seta evidencia a deleção da região para o gene p53 do cromossoma 17 .....	70

Figura 20 - Cariograma da amostra 4 obtido por cultura com TPA (protocolo A). As setas evidenciam trissomias dos cromossomas 12 e 18 .....	71
Figura 21 - Cariograma da amostra 28 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia a deleção da região q13 a qter do cromossoma 11 .....	72
Figura 22 - Cariograma da amostra 10 obtido por cultura com TPA (protocolo A). As setas evidenciam translocações entre os cromossomas 7 e 14 (bandas q22 e q22, respectivamente) e entre os cromossomas 13 e 17 (bandas p10 e q10, respectivamente) e ainda a presença de um cromossoma 12 extra.....	73
Figura 23 – Visualização da hibridização da sonda para o gene RB1 (13q14) com dois núcleos celulares aos quais foi aplicada a técnica FISH. As setas evidenciam o único sinal detectado (amostra 45), identificando a deleção do <i>locus</i> .....	79
Figura 24 - Observação em núcleos celulares dos sinais de fluorescência após hibridização <i>in situ</i> com sonda $\alpha$ -satélite para o cromossoma 12. As setas evidenciam a presença de 3 sinais para o centrómero do cromossoma 12 nos três núcleos (amostra 34) .....	80
Figura 25 - Metáfase e núcleo celular aos quais foi aplicada a técnica FISH, com sonda para o cromossoma 17p13. A seta evidencia a presença de um só sinal (a vermelho) para a região codificadora do gene p53 (amostra 38), indicando positividade para a deleção deste <i>locus</i> .....	81

## **Índice de tabelas**

Tabela 1 - Principais contributos no conhecimento da LLC entre 1917 e 1973.....	24
Tabela 2 – Registo dos resultados obtidos por citogenética convencional das cinquenta amostras de LLC-B englobadas neste estudo.....	66
Tabela 3 – Cariótipo estabelecido para cada uma das amostras em estudo.....	74
Tabela 4 - Registo dos resultados obtidos por FISH das cinquenta amostras de LLC-B englobadas neste estudo.....	77

**Lista geral de abreviaturas e siglas**

- ABL – Derivado de *Abelson*  
add – Material adicional (de *additional*)  
AT – Adenina e timina  
ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*  
BCL1 – *B-cell CLL/lymphoma 1*  
BCL2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*  
BCL3 - *B-cell CLL/lymphoma 3*  
BCMS - *B-cell neoplasia-associated gene with multiple splicing*  
BCMSUN - *B-cell neoplasia-associated gene with multiple splicing upstream neighbour*  
BCR – *Breakpoint cluster region*  
Bp – *Base pairs*  
BRCA2 – *Breast cancer type 2*  
CDKN2A - *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*  
cDNA – *Complementary DNA*  
CDRs – *Complementarity determining regions*  
CGH – *Comparative genomic hybridization*  
C<sub>H</sub> – Região constante da cadeia pesada das imunoglobulinas  
C<sub>L</sub> – Região constante da cadeia leve das imunoglobulinas  
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
DBM – *Disrupted in B cell malignancies*  
del – Delecção  
der – Derivativo  
DNA - *Deoxyribonucleic acid*  
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
FAB – *French-American-British Group*  
FISH – *Fluorescence in situ Hybridization*  
GC – Guanina e citosina  
GTG – Bandas G formadas por acção da tripsina e coradas com Giemsa  
GTL – Bandas G formadas por acção da tripsina e coradas com Leishman  
HIS – Hibridização *in situ*

HTLV-1 - *Human T lymphotropic virus type 1*

Ig – Imunoglobulina

IgV<sub>H</sub> – Região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas

IL – Interleucina

inv - Inversão

ISCN - *International System for Human Cytogenetics Nomenclature*

IWCCLL- *International Working Party on Chromosomes in CLL*

Kb – Kilobases

KCl – Cloreto de potássio

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LLC – Leucemia Linfocítica Crónica

LLC-B – Leucemia Linfocítica Crónica do tipo B

LMA – Leucemia Mielóide Aguda

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

Mb – Megabases

Mbr – *Major breakpoint region*

Mcr – *Minor cluster region*

MDM2 – *Mouse double minute 2*

M-FISH – *Multicolor fluorescent in situ hybridization*

MHC - *Major histocompatibility complex*

mIg – Imunoglobulina membranar

MLL - *Myeloid/lymphoid ou mixed lineage leukaemia*

NaCl – Cloreto de sódio

NCAM – *Neural cell adhesion molecule*

NCI – *National Cancer Institute*

NCIWG - *National Cancer Institute-sponsored Working Group*

NF2 - *Neurofibromatosis type 2*

NK – *Natural Killer*

p – Braço curto do cromossoma

PBS – *Phosphate buffered saline*

Ph – *Philadelphia*

PHA – *Phytohemagglutinin*

PLL – *Prolymphocytic leukaemia*

q – Braço longo do cromossoma

qter – Região terminal do braço longo do cromossoma

RB1 – *Retinoblastoma 1*

RDX – *Radixin*

mRNA – *Messenger ribonucleic acid*

SLL - *Small lymphocytic lymphoma*

SKY – *Spectral Karyotyping*

SSC – *Saline-sodium citrate*

t – Translocação

TNF1 – *Tumor necrosis factor 1*

TPA - *Phorbol ester, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate*

TTAGGG – Timina, timina, adenina, guanina, guanina, guanina

V<sub>H</sub> – Região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas

V<sub>L</sub> – Região variável da cadeia leve das imunoglobulinas

WHO – *World Health Organization*

ZAP-70 - *Zeta-associated protein 70*

**Introdução****1. Apoio da Citogenética ao Cancro Hematológico**

A citogenética é um ramo da genética que estuda a estrutura, número, função e comportamento biológico e patológico dos cromossomas. Pode ser dividida em citogenética clássica (ou convencional), que se baseia na análise dos cromossomas de células em divisão e citogenética molecular, que engloba técnicas essencialmente com base em hibridização *in situ*, independentes da obtenção de células em divisão. [12; 13; 14]

O apoio prestado pela citogenética à área clínica, nomeadamente à oncologia, é relevante, uma vez que permite detectar as anomalias cromossómicas presentes nas células malignas, auxiliando no diagnóstico, no aconselhamento genético, na escolha da terapia a aplicar e no prognóstico.

A optimização de protocolos de cultura celular e a aplicação de métodos de bandeamento (desenvolvidos na década de 70) para análise das células cancerígenas são dois dos principais responsáveis pelo progresso crescente do conhecimento das anomalias envolvidas em algumas doenças oncológicas, despertando uma enorme expectativa no que diz respeito ao contributo da citogenética para o conhecimento dos mecanismos que despoletam o cancro. [15]

Em 1960, Nowell e Hungerford descreveram a primeira anomalia consistente numa neoplasia humana: o cromossoma *Philadelphia* (Ph) encontrado em células de pacientes com Leucemia Mielóide Crónica (LMC). Entre 1970 e 1980, a investigação de outras alterações genéticas recorrentes em certas leucemias e linfomas expandiu, levando à caracterização de várias anomalias cromossómicas específicas de neoplasias. Diversos estudos se seguiram e desde então, os dados acerca das alterações genéticas associadas ao cancro aumentaram e, actualmente, há mais informação disponível acerca de leucemias e linfomas do que acerca de tumores sólidos, devido à facilidade de obtenção de amostras de medula óssea ou sangue periférico de pacientes com leucemia, associado às dificuldades de cultura celular e consequente qualidade fraca das metafases dos tumores sólidos. [15; 16; 17; 18; 19]

Existe uma relação entre as alterações cromossómicas consistentes das neoplasias humanas e os oncogenes. Através da análise molecular dos pontos de quebra dessas

anomalias cromossómicas detectaram-se alterações na estrutura e no nível de expressão de oncogenes localizados nesses *loci*. Os oncogenes podem desempenhar um papel preponderante no processo de transformação das células sanguíneas normais em células malignas, como se verifica, por exemplo, na LMC cuja anomalia genética consiste numa translocação recíproca equilibrada entre os cromossomas 9 e 22, designada em 1960 por cromossoma Ph, como referido anteriormente. O proto-oncogene ABL (9q34), quando translocado e adjacente a uma região do gene BCR (22q11), resulta na formação de um gene quimérico, que contém sequências codificadoras para ambas as respectivas proteínas. Como consequência desta alteração genética é produzida uma proteína de fusão maior (BCR/ABL) localizada na superfície da membrana celular e que é responsável pela transformação das células mielóides, visto que adquire uma nova função na transmissão de sinais reguladores de crescimento para o núcleo. [15; 19]

O estudo das alterações cromossómicas das leucemias tem duas funções essenciais:

- Proporcionar um diagnóstico mais preciso, fornecendo informação para prognóstico e para selecção da terapia adequada a cada paciente;
- Identificar os locais propícios a rearranjos consistentes, fornecendo a sua localização precisa de modo a isolar e clonar o DNA destas regiões para posteriores investigações. [15]

Apesar do aparecimento de técnicas moleculares, como é o caso da Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), muito do actual conhecimento sobre o significado das anomalias cromossómicas no cancro deve-se à citogenética clássica. [15; 19]

## **2. FISH e sua aplicação na Hematologia**

É uma técnica que tem sido muito utilizada nos últimos anos, uma vez que permite aumentar a exactidão do diagnóstico, ao ultrapassar determinadas limitações da citogenética convencional, nomeadamente a dificuldade de detecção de rearranjos que envolvam fragmentos de DNA com menos de 2 Megabases (Mb) e a dependência da qualidade das preparações obtidas, especialmente limitante no que toca ao estudo de amostras de leucemias cujo índice mitótico *in vitro* é baixo, proporcionando metafases, em geral, de fraca qualidade, com cromossomas de pequena dimensão e escassa resolução de bandas. É aplicada, particularmente, no mapeamento genético, citogenética



molecular, como complemento dos métodos citogenéticos clássicos, na caracterização de rearranjos cromossómicos e cromossomas *marker*, na detecção de microdeleções e no diagnóstico pré-natal de aneuploidias comuns. Tem prestado um grande contributo no conhecimento da patogenia de algumas neoplasias. [20]

Baseia-se no princípio da detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos em material citológico fixo numa lâmina, sob um microscópio de epifluorescência, através da utilização de sondas de DNA específicas para determinado *locus*, marcadas com um fluorocromo (molécula repórter) ou capazes de se associarem indirectamente com eles. [21; 22]

Combina a citogenética convencional com a biologia molecular, permitindo detectar sequências de DNA em cromossomas metafásicos ou núcleos em interfase. Obedece a quatro princípios:

- **Sensibilidade** – permite identificar rearranjos e deleções submicroscópicos, não detectáveis por citogenética convencional;
  - **Especificidade** – material de origem desconhecida ou incerta pode ser identificado através de sondas específicas (identificação de cromossomas *marker*, por exemplo);
  - **Eficiência** – proporciona uma visualização rápida de um grande número de metafases ou núcleos em interfase para determinado cromossoma ou sequência;
  - **Aplicabilidade** – permite a visualização de várias células de uma ampla gama de tecidos que não poderiam ser directamente usados por citogenética convencional.
- [20]

### 2.1. **Perspectiva histórica**

O emprego desta técnica teve início no fim da década de 60, quando Gall e Pardue anunciaram a hibridização de sondas de DNA radioactivas complementares a sequências repetitivas pericentroméricas dos cromossomas de rato e de *Drosophila*. Mais tarde, Harper, Malcolm e seus respectivos colaboradores detectaram a localização de genes individuais nos cromossomas humanos através de autorradiografia, permitindo o mapeamento dos respectivos genes nos *loci* específicos. Devido a estes métodos de marcação do DNA com radioisótopos e detecção autorradiográfica das sequências hibridizadas, esta técnica foi denominada de hibridização *in situ* isotópica (HIS). [20; 23]

De modo a ultrapassar a dificuldade e custos do emprego de sondas radioactivas, foram sendo desenvolvidos outros métodos, de hibridização *in situ* não isotópica, que, em relação aos anteriores, eram mais vantajosos, nomeadamente: mais rápidos, mais sensíveis, mais seguros – tendo em conta que não empregam material radioactivo – e eficientes. São exemplos: os sistemas de marcação por fluorescência, sistema de detecção biotina-avidina, e de imunodeteção (antideoxigenina, por exemplo). Landegent e seus colaboradores (1985) foram os responsáveis pelas primeiras hibridizações *in situ* por fluorescência documentadas. O progresso, em paralelo com a técnica FISH, dos microscópios e dos métodos de processamento, análise e armazenamento de imagens via computador facilitou a gestão dos dados. [20; 23; 24; 25; 26]

Recentemente, têm-se verificado avanços significativos na descoberta de novas técnicas FISH, que apresentam inovações diversas em relação à técnica base, incluindo: a hibridização genómica comparativa (CGH), *fiber* FISH, microdissecção cromossómica, cariotipagem espectral (SKY), *multicolor* FISH (M-FISH), entre outras. [21]

A disponibilidade crescente de novos fluorocromos e sistemas de detecção sensíveis, aliada à variedade de alvos celulares a que pode ser aplicada, facilidade de execução e rapidez na obtenção de resultados, têm tornado a FISH uma técnica amplamente empregue em muitos laboratórios. Contudo, os custos elevados, em especial das sondas comercializadas em *kits*, têm causado algumas restrições quanto à sua aplicação. [20; 22]

## 2.2. Tipos de sonda

Os componentes básicos da FISH são a sonda e a sequência alvo (*locus*) com a qual a sonda hibridiza. As sondas empregues em FISH são sequências simples de ácidos nucleicos, DNA ou RNA, complementares aos *loci* que se pretendem estudar e a escolha das mesmas deve ser feita de acordo com o tipo de anomalia a investigar. Actualmente, existe uma panóplia de sondas disponíveis no mercado, sendo que a maioria delas é obtida a partir de fragmentos de DNA isolados, purificados e amplificados para uso no Projecto do Genoma Humano e que foram conservados por inserção em bactérias que os replicam continuamente. [22; 23; 27; 89]

De acordo com o estudo a realizar, assim são seleccionadas as sondas adequadas: sondas para *painting* do cromossoma, *painting* de um braço em específico, sondas de sequência repetitiva, de sequência única, entre outras:

- **Sondas para *painting* do cromossoma** - São sondas complexas que contêm sequências específicas para todo o cromossoma, utilizadas para detectar os pares de cromossomas em núcleos interfásicos ou metafases. Podem ser compostas por diferentes fragmentos de cDNA ou DNA genómico clonado. A sua utilização está indicada para o estudo de rearranjos complexos como translocações subtis ou que envolvam mais de dois cromossomas e identificação de cromossomas *marker* ou em anel. [22; 27]
- **Sondas de sequência repetitiva** - Contêm cerca de 100 a 500 cópias de uma sequência. Incluem as sondas para os centrómeros dos cromossomas e regiões adjacentes, a maioria definida como DNA-satélite. O DNA-satélite consiste em sequências de DNA altamente repetitivas, com diferente organização, abundância e complexidade, podendo ser separadas por centrifugação diferencial em várias fracções: DNA  $\alpha$ -satélite, DNA  $\beta$ -satélite e DNA-satélite clássico. DNA  $\alpha$ -satélite localiza-se nos centrómeros de todos os cromossomas; DNA  $\beta$ -satélite na heterocromatina pericêntrica dos cromossomas acrocênticos; DNA-satélite clássico são repetições curtas localizadas na heterocromatina pericêntrica dos cromossomas 1, 9, 15, 16 e braço longo do Y. São normalmente empregues para avaliar a presença de aneuploidias (DNA  $\alpha$ -satélite), para identificar a linhagem parental de um determinado cromossoma (DNA  $\beta$ -satélite) ou para complementar outro tipo de sonda (DNA  $\beta$ -satélite e DNA-satélite clássico). [23; 27]
- **Sondas de sequência única** – São sondas de cDNA com um mínimo de 1.000 pares de bases (bp) que detectam sequências específicas nos cromossomas. Incluem sondas dirigidas para os telómeros, sondas para a área da oncologia, sondas de microdelecção, entre outras e são empregues para detectar *loci* específicos dos cromossomas, sendo particularmente úteis na identificação de rearranjos teloméricos e pequenas deleções e duplicações. As sondas teloméricas são complementares às sequências TTAGGG que se encontram em repetição nos telómeros humanos. São utilizadas para detectar a ausência de telómeros, como no caso dos cromossomas

em anel ou em translocações envolvendo regiões terminais dos cromossomas. [22; 23; 27]

### 2.3. Factores condicionantes

É necessário ter em conta determinados aspectos para o sucesso da técnica - preparação das lâminas, fixação adequada da amostra, concentração, complexidade e marcação da sonda e condições de hibridização (temperatura e tempo de hibridização, pH, presença de catiões monovalentes) - como se descreve em seguida:

- **Concentração da sonda** – Ao contrário do que se possa pensar, aumentar a concentração da sonda não melhora necessariamente a eficácia da sua ligação ao DNA alvo, visto que, além desta reacção, também ocorre em simultâneo a reassociação da sonda que predominará se a sua concentração estiver acima do valor óptimo;
- **Temperatura** – Normalmente, a temperatura óptima de hibridização ronda os 37 °C;
- **pH** - São frequentemente empregues tampões de pH entre 6,5-7,5;
- **Presença de catiões monovalentes** – Os catiões ( $\text{Na}^+$ , por exemplo) interagem com os grupos fosfato dos ácidos nucleicos, levando ao aumento da repulsão electrostática entre as duas cadeias do DNA com o aumento da concentração salina. Os catiões divalentes estabilizam a cadeia dupla de DNA e deve ser evitada a sua presença aquando da hibridização através da adição de agentes quelantes como o EDTA. [20; 22]

### 2.4. Poder de resolução

Em cromossomas metafásicos, o limite do poder de resolução da FISH aproxima-se dos 2-3 Mb, enquanto que, tratando-se de cromossomas interfásicos, a resolução pode ultrapassar as 50 Kilobases (Kb), uma vez que as fibras da cromatina estão menos condensadas. Se a técnica for precedida de tratamento dos cromossomas, de maneira a libertar as fibras cromossómicas das moléculas proteicas estruturais (*fiber-FISH*), o limiar da resolução pode atingir valores da ordem das 5 Kb. Rooney, D. E. (2001), aplicou a FISH para localizar sequências alvo com uma única cópia inferior a 1 Kb. No entanto, quanto menor é o tamanho da sonda, mais fraco é o sinal e maior a dificuldade em distinguir sinais de hibridização da sonda com o alvo do “ruído de fundo”. Por outro lado,

fragmentos demasiado grandes formam agregados que se ligam não especificamente, pelo que, na generalidade, o tamanho mínimo da sonda para a detecção de sequências com uma única cópia ronda 1-5 Kb. [22; 28]

### 2.5. **FISH versus Citogenética convencional**

Face às técnicas de citogenética convencional, são várias as vantagens da FISH:

- Requer pouco material;
- Não são necessárias células em mitose;
- Fornece resultados num curto espaço de tempo;
- É relativamente fácil de realizar;
- Pode-se utilizar em material de arquivo. [29]

No entanto, e ao contrário da citogenética, não permite a visualização global do cariótipo, pelo que é necessário saber o que se procura, isto é, ter uma suspeita prévia da anomalia cromossómica antes da realização da técnica FISH.

## 3. Leucemias

### 3.1. **Introdução**

Leucemias são neoplasmas monoclonais que resultam de mutações adquiridas em células hematopoiéticas progenitoras, podendo estas estar em diferentes estádios de diferenciação mielóide ou linfóide, levando à proliferação anormal das mesmas. [15; 30; 31]

Durante a hematopoiese ocorrida em condições normais, as células estaminais da medula sofrem diferenciação em tipos específicos de células. No caso de situações patológicas, a diferenciação celular e/ou morte celular via apoptose é bloqueada, levando à substituição gradual das células normais (heterogéneas) do sangue periférico por células imaturas clonais (homogéneas) e, eventualmente, invasão dos nódulos linfáticos, fígado, baço e muitos outros órgãos vitais. A leucemia está associada, frequentemente, com um aumento anormal de leucócitos levando a anemia, neutropenia e trombocitopenia e, quando o tratamento administrado é ineficaz, levará à morte do paciente, frequentemente como resultado de infecções e outras complicações da doença. [15]

### 3.2. Perspectiva histórica

A descrição das leucemias como entidades distintas teve lugar há mais de 150 anos, e despoletou discussão científica visto que alguns investigadores argumentavam que a leucemia não apresentava causas, sintomas, lesões anatómicas ou tratamento específico que permitisse catalogá-la como uma doença distinta. [1; 32]

Existe alguma controvérsia em relação à atribuição da descoberta da leucemia. Em 1839, Barth e seu colega Donne, terão observado ao microscópio o sangue de um paciente ainda vivo com leucemia. Contudo, em 1845, John Hughes Bennet (Escócia) e Rudolph Virchow (Alemanha) descreveram aqueles que seriam considerados os primeiros casos de leucemias após autópsias dos seus respectivos doentes, gerando alguma competição, uma vez que cada um deles anunciava ter sido o pioneiro. Da observação microscópica do sangue do seu paciente, Virchow detectou a presença de “corpos brancos ou descorados”, passando a denominar a patologia por “*weisses blut*” (de *white blood*). Após revisão do trabalho de outros investigadores (Bennet, Craige e Fuller), Virchow afirmou que aqueles corpúsculos estavam sempre presentes no sangue normal e sugeriu que o aumento do número destes corpúsculos no seu paciente não era devido a infecção mas sim característica própria desta patologia, levando ao estabelecimento do termo “*leukamiae*” para sua designação (1847). Em 1852, Bennet publicou a descrição de trinta e sete casos de leucemia (dezassete deles diagnosticados em vida). [1; 32]

Quatro anos depois, Virchow dividiu esta doença em duas formas:

- “**Esplénica**” ou “**lineal**” – associada com o alargamento do baço e presença dos “corpúsculos descorados”;
- **Linfática** – associada ao alargamento dos nódulos linfáticos e presença dos “corpúsculos descorados”. [32]

Posteriormente, em 1857, Friedreich sugeriu que as leucemias podiam ser classificadas em dois tipos, agudas e crónicas, e analisou os seus atributos clínicos e patológicos. [1]

A origem dos “corpúsculos descorados” e dos “corpúsculos vermelhos” do sangue só foi estabelecida a partir de meados do século XIX, tendo sido Ernest Neumann (1870), após examinar a medula óssea de um paciente que havia falecido de leucemia

“esplénica”, quem propôs que a medula era o local de produção desses “corpúsculos descorados”. No final da década de 70, Gowers sugeriu que a anemia diagnosticada nos pacientes com leucemia podia ser causada pela diminuição da produção ou aumento da destruição dos glóbulos vermelhos. [1; 32]

Em 1891, Paul Ehrlich desenvolveu um método de coloração das células sanguíneas (método de coloração triácido) que levou à classificação das leucemias em mielóide e linfóide e à correlação de aspectos clínicos com descobertas morfológicas características. Este método permitia a clara distinção entre o núcleo, citoplasma e os três tipos de granulócitos (eosinófilos, basófilos e neutrófilos). Em 1898, Hirschfeld identificou as células não-granulares na medula óssea e descreveu o processo do seu desenvolvimento em granulócitos, denominados dois anos depois por Naegeli de “mieloblastos”. [1; 32; 33]

### 3.3. Classificação das leucemias e incidências

Actualmente, e em termos clínicos, as leucemias podem ser divididas em dois grupos:

- **Agudas** – os pacientes, normalmente, começam repentinamente a apresentar sintomas (como anemia, leucopenia ou trombocitopenia), que são atribuídos a falha da função normal da medula óssea, levando à morte a curto prazo. As células neoplásicas são blastos pouco diferenciados e a doença requer tratamento imediato e agressivo;
- **Crónicas** - os pacientes começam a apresentar sintomas de forma gradual. Habitualmente, a início, a medula óssea funciona com regularidade e as células neoplásicas são diferenciadas. Normalmente a terapia administrada a estes pacientes é menos agressiva que no caso anterior e, por vezes, nem é necessária. [15; 30]

Dentre estes dois grupos, e de acordo com métodos morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos, as leucemias ainda podem ser classificadas segundo a linhagem mielóide ou linfóide, e indicando o tipo de célula predominante. Segundo Lin, P. e Medeiros, J. (2005), quatro grupos são gerados por este sistema de classificação, sendo a leucemia mielóide aguda (LMA) a mais comum (≈10.000 novos casos diagnosticados/ano), seguida da leucemia linfocítica crónica (LLC, com 8.000 casos novos por ano), a leucemia mielóide crónica (LMC, com incidência anual de 4.500 novos



casos) e, finalmente, a leucemia linfoblástica aguda (LLA, com 3.100 novos casos por ano). [15; 30]

Actualmente, são usados dois sistemas de classificação de leucemias: o sistema FAB (de *French-American-British Group*) e, mais recentemente, o sistema estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO). Em ambos os sistemas, as leucemias mielóides podem ser subdivididas de acordo com a linhagem granulocítica, monocítica, eritróide e megacariocítica, enquanto que as leucemias linfóides são divididas em tipo B ou T, de acordo com a linhagem de linfócitos. A inovação do sistema da WHO consiste no facto de acrescentar mais informação relacionada com anomalias imunofenotípicas e moleculares envolvidas na patogénese destas doenças. [30]

### 3.4. Leucemia Linfocítica Crónica do tipo B (LLC-B)

Visto que a LLC-B é um tipo de neoplasia que afecta, como o nome indica, os linfócitos B, antes de abordar os principais tópicos relacionados com esta patologia, procede-se a uma descrição da maturação e diferenciação das células B, de modo a consolidar alguns conceitos necessários para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogenia desta doença.

#### 3.4.1. Linfócitos B

O processo que resulta na produção de células plasmáticas e células de memória B consiste numa sequência de eventos que pode ser dividida em três grandes passos: a geração das células B maduras e imunocompetentes (maturação), activação das células B maduras aquando da sua interacção com um antigénio<sup>1</sup> e a diferenciação das células activadas em células plasmáticas e células de memória.

---

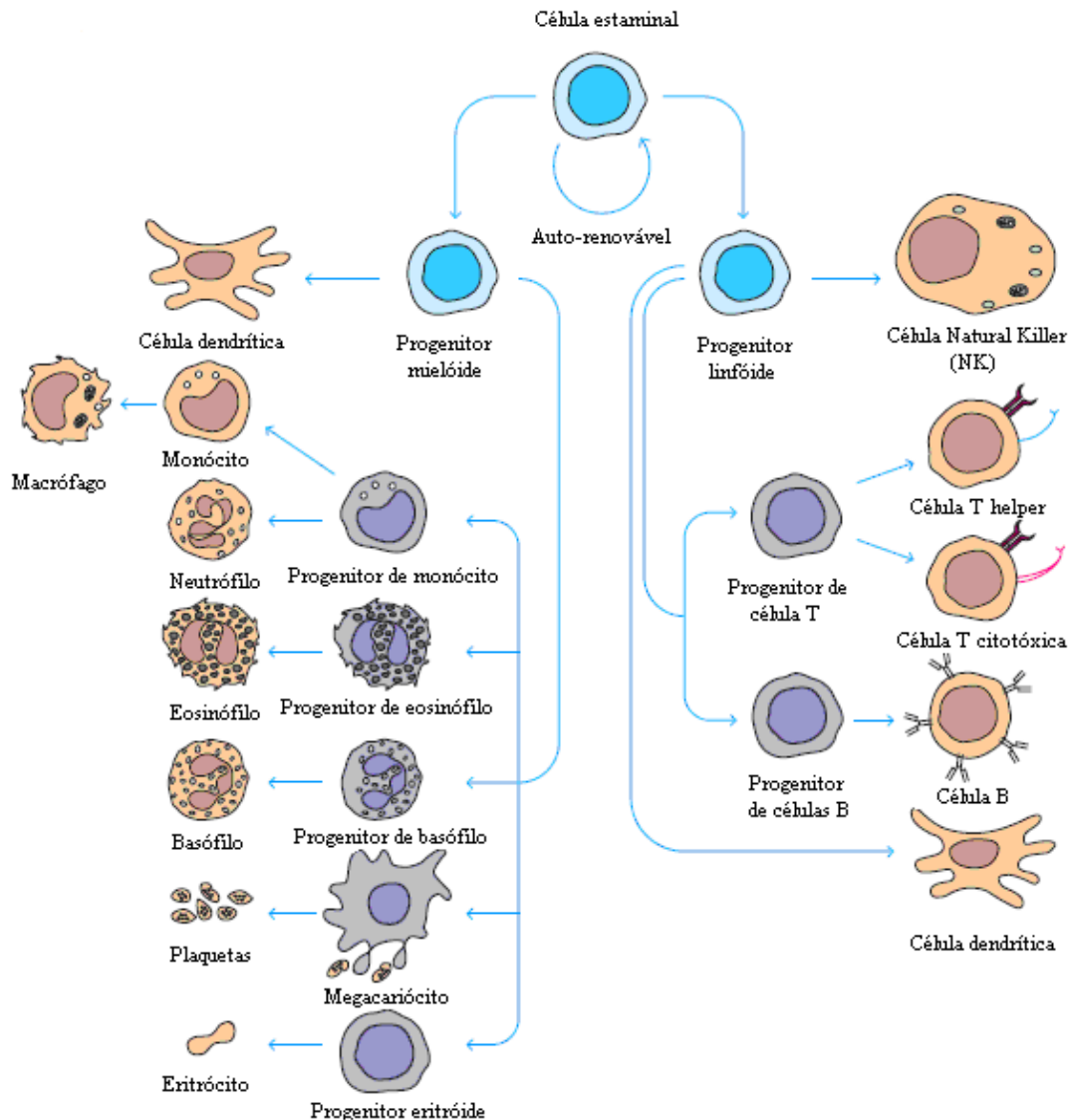
<sup>1</sup> **Antigénio** – É uma substância que despoleta a produção de anticorpos e provoca uma resposta por parte do sistema imunitário. [82]



### 3.4.1.1. Maturação dos linfócitos B

Todas as células sanguíneas derivam de um tipo de célula indiferenciada, denominada célula estaminal hematopoiética, que tem capacidade de diferenciação em vários tipos celulares (diz-se, por isso, pluripotente). A diferenciação ocorre na medula óssea pós-natal, e pode seguir duas vias (**Figura 1**):

- A via que origina uma célula linfóide progenitora – que levará à formação de células B, T e NK (*natural killer*) e de algumas células dendríticas;
- A via que origina uma célula mielóide progenitora – que levará à formação das células sanguíneas: glóbulos vermelhos, glóbulos brancos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, mastócitos, células dendríticas) e plaquetas. [34; 35]



**Figura 1** – Diagrama representativo da hematopoiese, salientando as duas vias possíveis e respectivas células formadas (adaptado de [34])

O desenvolvimento das células B tem início com a diferenciação da célula estaminal linfóide na primeira célula da linhagem B – a célula B progenitora (célula pro-B) que expressa um marcador transmembranar designado CD45. [34]

A célula pro-B prolifera na medula e diferencia-se numa célula precursora das células B (célula pre-B). Este passo requer a presença das células do estroma da medula e do microambiente por elas criado, uma vez que estas interagem directamente com as

células pro-B e pre-B e segregam várias citocinas<sup>2</sup>, como a Interleucina<sup>3</sup> 7 (IL-7), que auxiliam em todo este processo de desenvolvimento. A IL-7 conduz o processo de maturação, induzindo as células pre-B a se destacarem das células do estroma e, a partir deste momento, as células precursoras B já não dependem daquele contacto directo, mas ainda requerem IL-7 para o seu crescimento e maturação. [34; 35]

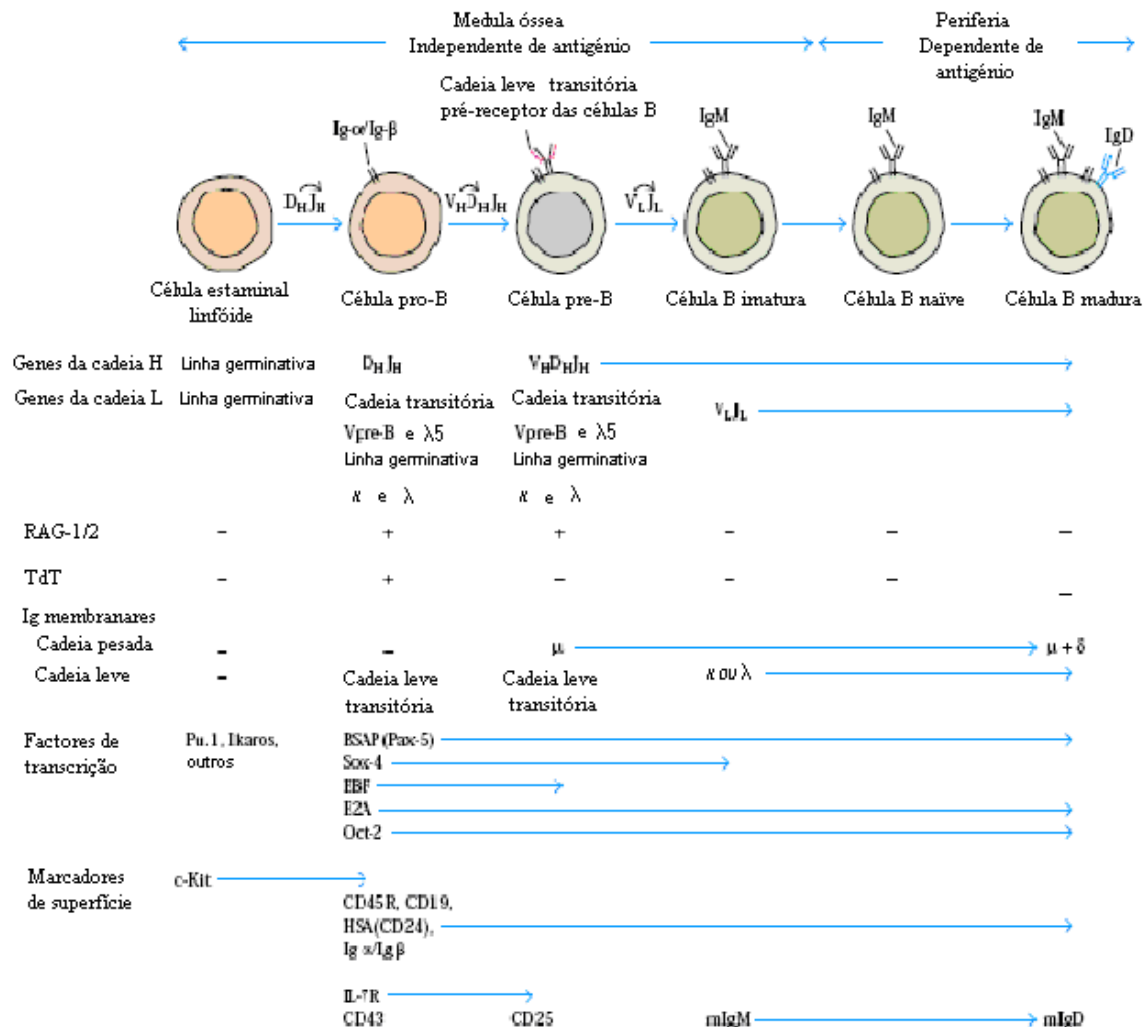
O passo seguinte do desenvolvimento das células B consiste no estágio da célula B imatura que expressa a imunoglobulina IgM, e à medida que esta se desenvolve numa célula B madura, são expressas ambas as imunoglobulinas IgM e IgD na superfície (**Figura 2**). Nesta fase, as células B maduras já estão preparadas para abandonar a medula óssea, começar a circular e localizar-se, eventualmente, em locais distintos dos órgãos linfóides periféricos. As células virgens (que ainda não contactaram com o antígeno específico) IgM/IgD localizam-se essencialmente na zona do manto dos folículos linfóides. [34; 35; 36]

A expressão dos genes para as imunoglobulinas (Ig) e a síntese dos seus produtos ocorre durante o processo da maturação, numa ordem bem definida que é essencial para o desenvolvimento de células B maduras: a formação das cadeias pesadas começa no estágio pro-B e a formação das cadeias leves tem início nas células pre-B, formando-se a imunoglobulina completa no estágio de célula B imatura. [34; 35]

---

<sup>2</sup> **Citoquinas** (ou citocinas) – Grupo de proteínas reguladoras ou glicoproteínas secretadas pelos glóbulos brancos ou outras células do organismo, em resposta a estímulos, e que têm como função mediar as interações entre células do sistema imunitário. [34]

<sup>3</sup> **Interleucina** – É um tipo de proteína constituinte do sistema imunitário, produzida principalmente por células T (mas também por macrófagos e células teciduais) envolvida na activação dos linfócitos e na indução da divisão de outras células. Cada interleucina actua sobre um grupo específico de células que expressam os receptores adequados para cada interleucina. [83]



**Figura 2** – Diagrama representativo da sequência de eventos e características dos estádios de maturação das células B (adaptado de [34])

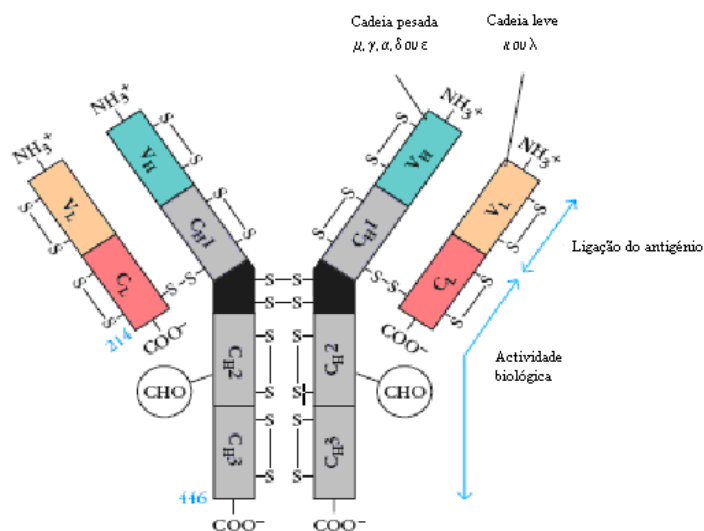
É produzido um grande número de linfócitos diariamente, e cerca de 5-15% das células linfóides circulantes no sangue são do tipo B, definidas pela presença de imunoglobulinas<sup>4</sup> (ou anticorpos) de superfície que funcionam como receptores de

<sup>4</sup> **Imunoglobulinas** - São glicoproteínas sintetizadas e excretadas por células plasmáticas derivadas dos linfócitos B (plasmócitos) em resposta ao contacto do sistema imunitário com um antígeno. [84]

antígenos específicos. A presença destas imunoglobulinas (Ig) distingue as células B maduras de outros linfócitos. [34; 35]

Imunoglobulinas são glicoproteínas constituídas por quatro cadeias polipeptídicas:

- duas cadeias leves idênticas – L;
- duas cadeias pesadas também idênticas – H (Figura 3).



**Figura 3** – Esquema representativo da estrutura de uma imunoglobulina (adaptado de [34])

Cada cadeia leve está ligada a uma pesada por ligações dissulfídicas e interações não covalentes (pontes de hidrogénio, por exemplo, entre outras). Ligações similares mantêm os dois pares juntos. [34; 35]

Ambas as cadeias possuem na região terminal amino ( $\text{NH}_3^+$ ) segmentos de elevada variabilidade designados por regiões V ( $V_L$  para as cadeias leves e  $V_H$  para as cadeias pesadas), que são constituídas por cem a cento e dez aminoácidos, aproximadamente. As diferenças na sequência destes aminoácidos são responsáveis pela especificidade de cada anticorpo, mais precisamente, nas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), também designadas por regiões hipervariáveis, presentes tanto nas cadeias leves como nas pesadas, que representam os locais de ligação dos antígenos. [34]

Além desta região com elevada variabilidade, existem outras com sequência relativamente constante, denominadas regiões C ( $C_L$  para as cadeias leves e  $C_H$  para as cadeias pesadas). A região constante da cadeia leve pode ser de dois tipos ( $\kappa$  e  $\lambda$ ) dependendo da sequência de aminoácidos. Cada molécula de anticorpo contém apenas um destes dois tipos de cadeia leve, nunca ambos. Na cadeia pesada existem cinco padrões de sequência aminoacídica, correspondentes a diferentes isotipos de cadeia pesada ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  e  $\alpha$ ). As cadeias pesadas dos anticorpos determinam a sua classe: IgM ( $\mu$ ), IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgD ( $\delta$ ) ou IgE ( $\epsilon$ ). [34; 35]

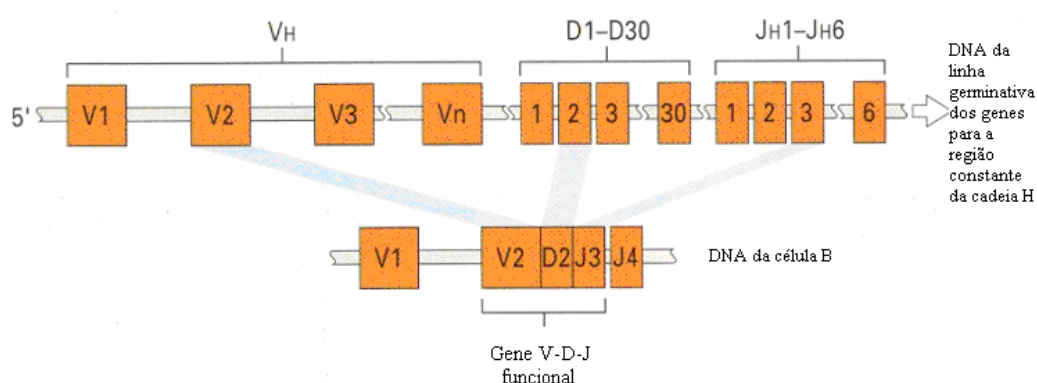
As células B que expressam as imunoglobulinas IgM e IgD representam 5-10% e 0,2%, aproximada e respectivamente, das células B humanas em circulação. Estas células virgens (ou *naïve*), que ainda não se encontraram com nenhum antígeno, circulam no sangue ou linfa e são transportados para os órgãos linfóides secundários, em especial o baço e os nódulos linfáticos. Cerca de 10-15% das células B circulantes expressam IgA e uma escassa percentagem expressa IgE. IgG é a imunoglobulina mais abundante no soro, representando cerca de 80% dos anticorpos totais. [34; 35; 36]

### **Rearranjos dos genes codificadores das Ig**

As cadeias pesadas (H) e as cadeias leves (L) de uma molécula de anticorpo são codificadas por conjuntos de sequências de genes designadas de segmentos genéticos que, durante a maturação dos linfócitos B, sofrem rearranjos de modo a formar genes funcionais para as imunoglobulinas. Nos humanos, os segmentos genéticos para as cadeias H situam-se no cromossoma 14 e para as cadeias L nos cromossomas 2 (isotipo  $\kappa$ ) e 22 (isotipo  $\lambda$ ). [34; 36]

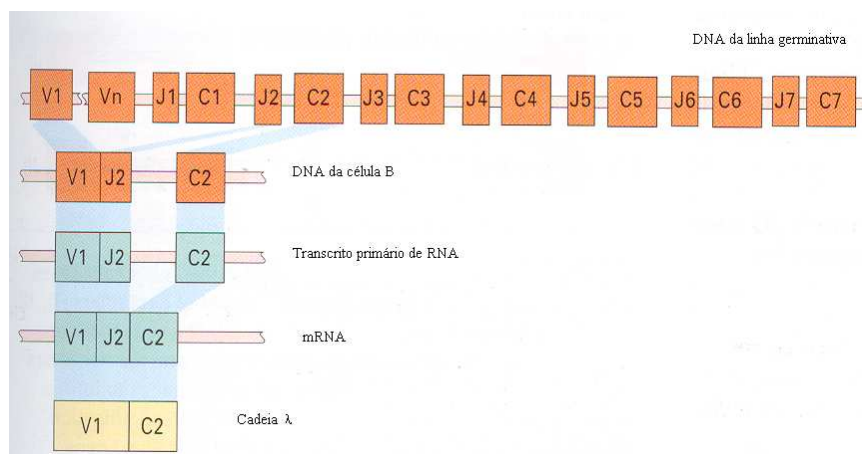
Os múltiplos genes para a região variável (V) situam-se na terminação 5' desses segmentos, enquanto que os genes para a região constante (C) se encontram na terminação 3'. Entre estas duas regiões localizam-se ainda os genes para as regiões D (de diversidade, pela sua contribuição para geração de diversidade dos anticorpos) presentes apenas nos segmentos genéticos codificadores das cadeias pesadas ( $D_H$ ) e os genes para as regiões J (de *joining*) presentes tanto nas cadeias pesadas ( $J_H$ ) como nas leves ( $J_L$ ). [34; 36]

A formação de uma molécula completa de imunoglobulina é um processo gradual que ocorre na medula óssea e prossegue segundo uma ordem definida. A cadeia pesada (**Figura 4**) é a primeira a ser sintetizada. Inicialmente, há a transcrição da região variável: um segmento  $D_H$  recombina-se com um segmento  $J_H$ , e, em seguida, o segmento resultante  $D_HJ_H$  liga-se a um segmento  $V_H$  para formar a unidade  $V_HD_HJ_H$  que codifica a região variável. [34; 35; 36; 37]



**Figura 4** – Representação esquemática dos segmentos genéticos para a cadeia pesada das imunoglobulinas, situados no cromossoma 14 (adaptado de [35])

Ocorre um processo similar para a formação das cadeias leves, embora neste caso estejam envolvidos apenas os segmentos  $V_L$  e  $J_L$ . Normalmente, os primeiros genes a sofrerem rearranjos são os que codificam a região variável da cadeia leve do isotipo  $\kappa$ , e se este processo não levar à codificação de uma cadeia funcional, ocorrem rearranjos dos genes que codificam a região variável do isotipo  $\lambda$  (**Figura 5**). No final deste processo, cada célula B tem uma única região variável funcional para a sua cadeia pesada e uma outra para a sua cadeia leve. [34; 35; 37]



**Figura 5** – Representação esquemática dos segmentos genéticos para a cadeia leve do isotipo  $\lambda$  das imunoglobulinas, situados no cromossoma 22 (adaptado de [35])

Por fim, e de maneira a produzir uma molécula de imunoglobulina funcional, os segmentos genéticos que codificam as regiões constantes das cadeias pesadas ( $C_H$ ) e leves ( $C_L$ ) sofrem rearranjos e são transcritos. Há diversos pontos de controlo da maturação das células B, que podem induzir a apoptose se o mRNA não tiver sido traduzido correctamente de modo a produzir uma imunoglobulina funcional. [34; 35; 36; 38]

A ampla gama de possibilidades de rearranjos destes genes contribui fortemente para a geração de diversidade dos anticorpos. Outro processo responsável pela variabilidade é a ocorrência de mutações somáticas. Há evidências de que a região de DNA que codifica a região V pode ser particularmente susceptível a mutação, tanto nos intrões como nos exões, que ocorre nos centros germinativos e depende das células T. [34; 35]



### ↪ **Marcadores<sup>5</sup> de superfície identificam os estádios de desenvolvimento**

Os linfócitos expressam moléculas na sua superfície que podem ser usados para distinguir (“marcar”) subtipos celulares e, dentro de cada subtipo, também podem ser usados para identificar a fase de desenvolvimento em que os linfócitos se encontram, tendo em conta que o padrão dos marcadores de superfície das células B sofre alterações durante o processo de maturação das mesmas. [35]

No estágio pro-B, as células expressam os marcadores CD45, CD19, CD43, CD24 e CD79a/CD79b (também designados Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$ ), sendo que estes dois últimos serão constituintes do receptor das células B, formado nos últimos estádios de desenvolvimento. Também nesta fase, está presente o c-Kit, um receptor para o ligando promotor do crescimento, presente nas células do estroma da medula. [34; 35]

À medida que as células progridem para o estágio seguinte (pre-B), muitos dos marcadores expressos anteriormente ainda estão presentes, cessa a expressão do c-Kit e CD43, e em contrapartida, começa a ser expresso o marcador CD25. Durante esta fase, há rearranjos da cadeia leve (posteriores aos da cadeia pesada, que têm início durante o estágio pro-B), surgindo a imunoglobulina IgM na superfície das células B. Após este processo, as células são classificadas como células imaturas e já não expressam o CD25. A maturação fica completa com a coexpressão de IgM e IgD. [34; 35]

### ↪ **Marcador CD5 define subtipo das células B**

O marcador CD5 é típico de células T. No entanto, uma pequena proporção de células B normais também o expressa. Esta descoberta levou à distinção de duas linhagens nos linfócitos B, denominadas B-1 (população CD5<sup>+</sup>) e B-2 (população CD5<sup>-</sup>, os linfócitos B “convencionais”). [39]

As células B-1 surgem no período embrionário e representam a maioria das células B na circulação fetal, diminuindo para valores de 60 a 80% das células circulantes no sangue do cordão umbilical. Também são as primeiras células B a surgir no fígado e nos

---

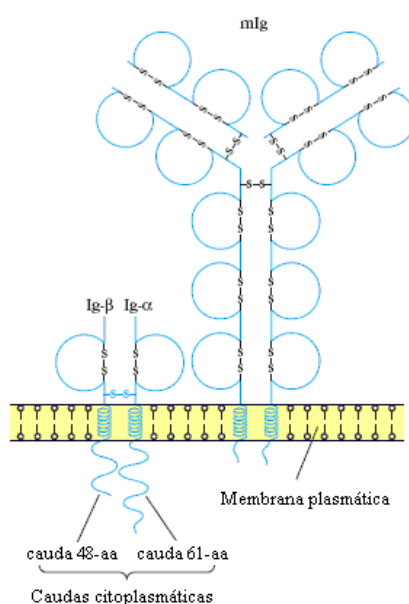
<sup>5</sup> **Marcador celular** – Molécula característica da membrana plasmática de uma célula, ou em alguns casos, de um tipo específico de célula, que a identifica. [85]

nódulos linfáticos em desenvolvimento no feto. Nos adultos, representam apenas 5 a 30% dos linfócitos B circulantes no sangue periférico, 10% no baço e menos de 30% nos nódulos linfáticos (localizadas sobretudo na zona do manto). A maioria das células B que não sofreu interação com antígeno (virgens) expressa CD5. [39]

Pelo contrário, as células do tipo B-2 desenvolvem-se após o nascimento e são geradas constantemente na medula óssea. Nos adultos, as células CD5<sup>-</sup> predominam no baço e nódulos linfáticos. [39]

### 3.4.1.2. Receptor das células B

O receptor das células B é uma proteína transmembranar complexa constituída por imunoglobulinas ligadas à membrana (mlg) e heterodímeros secundários, designados por Ig- $\alpha$  (CD79a) / Ig- $\beta$  (CD79b), que estão ligados por pontes dissulfídicas e associados com o receptor primário (conjunto das quatro cadeias polipeptídicas descritas anteriormente) (Figura 6).



**Figura 6** – Esquema representativo da estrutura de um receptor funcional das células B (adaptado de [34])

A ligação deste heterodímero com uma molécula de mIg constitui o receptor funcional das células B. Estas cadeias Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$  são longas de modo a permitir a sua interacção com moléculas sinalizadoras intracelulares para activação celular. [34; 35; 39]

Antes da expressão do receptor B funcional forma-se um pré-receptor durante a diferenciação das células B. Após os rearranjos dos segmentos que codificam a região variável da cadeia pesada das imunoglobulinas, a célula pre-B resultante começa a proliferar e produz uma cadeia pesada Ig $\mu$  que se liga à membrana (mIg $\mu$ ) e se associa a uma cadeia leve transitória específica (constituída pelas proteínas  $\lambda 5$  (com sequência semelhante a uma região constante) e V<sub>preB</sub> (com sequência semelhante a uma região variável)) e ao heterodímero Ig- $\alpha$ /Ig- $\beta$ . Este pré-receptor é importante para a diferenciação dos linfócitos B, uma vez que apenas as células que o expressam são capazes de prosseguir para as fases seguintes da maturação. Após os rearranjos da cadeia leve, posteriores aos da cadeia pesada, este pré-receptor é substituído pelo receptor B funcional descrito previamente. [40; 41]

### **3.4.1.3. Diferenciação das células B**

Quando uma célula B virgem encontra o antígeno complementar ao anticorpo da sua membrana pode seguir duas vias:

- provoca a divisão rápida da célula (proliferação clonal) e a sua descendência diferencia-se em células B efectoras (células plasmáticas), que produzem grandes quantidades de anticorpos e têm uma curta sobrevivência;
- forma centros germinativos, onde pode alterar o seu isotipo e, portanto, a classe dos anticorpos que produz, e sofrer uma série de rearranjos nos genes V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> das imunoglobulinas, antes de se diferenciar em célula de memória, que tem um tempo de vida mais longo que a célula efectora. [34; 35; 36]

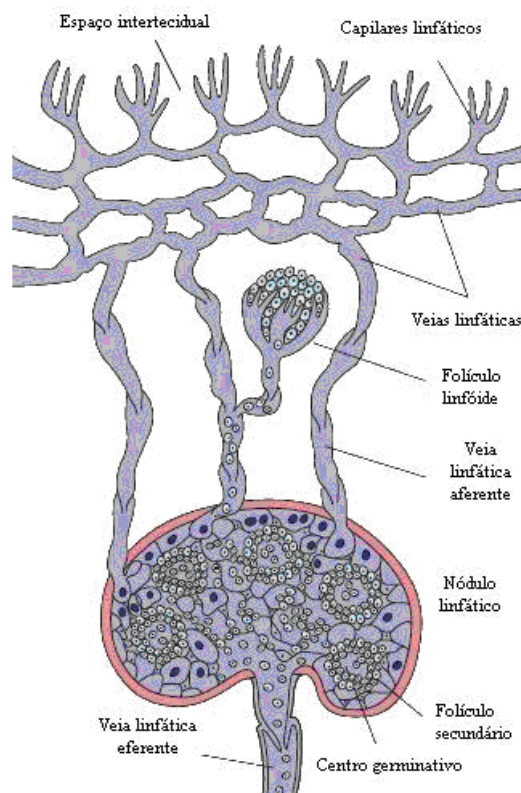
Os mecanismos que determinam a via seguida pela célula B após contacto com o antígeno permanecem desconhecidos, mas podem estar relacionados com a natureza da célula virgem, o tipo de antígeno, a afinidade e especificidade do receptor das células B, entre outros. A interacção da célula B *naïve* com células T e macrófagos também pode induzir estes mecanismos. [34; 35]

### ↳ Folículo linfóide

Alguns dos tecidos linfáticos dispersos pelo organismo estão organizados em estruturas designadas folículos linfóides, constituídos por agregados de células linfóides e não linfóides rodeadas por uma rede de capilares linfáticos (**Figura 7**). Até ser activado por um antígeno, um folículo linfóide (folículo primário) é composto por uma rede de células dendríticas foliculares e pequenas células B em estado dormente. [34]

Após activação antigénica, o folículo primário aumenta de tamanho e origina um folículo secundário, com os linfócitos B dormentes e células dendríticas acondicionados em forma de anéis, circundando os centros germinativos. Nestes centros, alguns dos linfócitos B activados proliferam, sofrem mutações somáticas dos genes codificadores das regiões variáveis ( $V_H/V_L$ ) dos anticorpos e alteram o isotipo que produzem, como resultado de interações entre as células B, células T *helper* e células dendríticas foliculares, que culminam na formação de células B plasmáticas e células de memória. Estas células de memória, que expressam caracteristicamente IgM ou IgG na superfície, deixam os centros germinativos e entram na circulação ou permanecem na zona marginal dos folículos linfóides. [34; 35; 36]

Durante estes processos ocorre uma selecção das células B: menos de 10% sobrevivem e diferenciam-se em células plasmáticas ou de memória, as restantes morrem por apoptose porque as mutações sofridas podem resultar em células B com receptores de baixa afinidade ou até com



**Figura 7** – Representação esquemática de um folículo linfóide secundário, com centros germinativos (adaptado de [34])

receptores para auto-antígenos. Portanto, a acumulação destas mutações marca a passagem das células B pelo centro germinativo. [34; 36]

### **3.4.2. Perspectiva histórica da LLC**

A maioria dos historiadores atribui o aparecimento da LLC às primeiras descrições de leucemia como uma entidade clínica reconhecida, elaboradas por John Hughes Bennet e Rudolph Virchow em 1845. O investigador Galton (1963), atribui a Virchow a primeira descrição de LLC cujo paciente apresentou um alargamento gradual e não doloroso dos nódulos linfáticos cervicais, axilares e inguinais durante 2 anos, e uma proporção de dois a três “corpúsculos brancos” para um “corpúsculo vermelho” após análise do sangue leucémico. Foi instituído o termo “pseudoleucemia” para descrever estes casos de alargamento de órgãos detectados durante a autópsia. Por outro lado, segundo Hamblin (2000), o caso descrito por Bennet poderia representar um caso de LLC, devido à observação, após autópsia do paciente, de corpúsculos sem cor descritos como células, contendo um grande núcleo. [33]

Em 1893, Kundrat instituiu o termo “linfossarcoma” como descritivo de uma condição que normalmente afectava os nódulos linfáticos ou membranas mucosas. Dez anos depois, Turk agrupou as leucemias linfáticas e os linfossarcomas num grupo que designou como “linfomatose”, mas sugeriu um método de diferenciação entre as duas doenças, baseado no facto de que os linfossarcomas afectam os nódulos linfáticos mas não se manifestam no sangue e medula óssea. No entanto, Turk focou que as transições entre linfossarcoma e LLC ocorrem de facto, e actualmente, esta distinção permanece ainda uma tarefa árdua. [32; 33]

William Osler, também contribuiu para o conhecimento da LLC, através do relato da sua experiência no hospital Johns Hopkins entre 1892 e 1909, no seu livro “*The Principles and Practice of Medicine*”, editado sete vezes. Vinte por cento de todas as leucemias descritas nessa publicação eram do tipo LLC, associadas a alargamento generalizado dos nódulos linfáticos e com taxas de sobrevivência de 3 a 11 anos. Contudo, permaneciam as dificuldades de distinção entre os termos “leucemia linfocítica crónica” e “linfossarcoma” devido às grandes semelhanças morfológicas destas doenças. [1; 32; 33]

A partir de 1924, o conhecimento acerca da história natural da doença, do diagnóstico e dos métodos de tratamento aumentou significativamente e os principais contributos estão sumariados na **Tabela 1**. [32; 33]

**Tabela 1** - Principais contributos no conhecimento da LLC entre 1917 e 1973

Investigador clínico	Ano	Descobertas relevantes
Ward	1917	<ul style="list-style-type: none"> <li>Análise de 1.457 casos de leucemia;</li> <li>Observações acerca da relação do sexo e idade do paciente com a LLC.</li> </ul>
Minot e Isaacs	1924	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publicação do primeiro relato clínico detalhado de um paciente com LLC, com um tempo médio de sobrevivência de 40 meses;</li> <li>Administração de radioterapia como tratamento.</li> </ul>
Leavell	1938	<ul style="list-style-type: none"> <li>Revisão da incidência e dos diversos factores que influenciam a sobrevivência nesta doença.</li> </ul>
Wintrobe e Hasenbush	1939	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publicação de dados clínicos de 86 pacientes com leucemia crónica (mielóide e linfóide), salientando a fase inicial da doença;</li> <li>A utilização de radiação ou de soluções de potássio arsénico não mostrou ser benéfica nos pacientes com LLC.</li> </ul>
Hayhoe	1960	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publicação do livro "<i>Leukemia</i>" com actualização rigorosa dos aspectos clínicos da LLC.</li> </ul>
Galton	Década de 1960	<ul style="list-style-type: none"> <li>Na publicação "<i>The natural history of chronic lymphocytic leukemia</i>" (1963) e noutra obra publicada em 1966, sumaria o seu conhecimento e experiência com a LLC;</li> <li>Criam-se as bases de um sistema de classificação em estádios, mais tarde usado por Rai e Binet;</li> <li>Descoberta de um indicador prognóstico importante: o tempo de duplicação dos linfócitos.</li> </ul>
Boggs <i>et al</i>	1966	<ul style="list-style-type: none"> <li>Publicação de dados acerca dos critérios de diagnóstico, características clínicas, resposta ao tratamento e sobrevivência de 130 pacientes com LLC seguidos na Universidade do Utah, pela Clínica Hematológica.</li> </ul>



Dameshek	1967	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proposta de um método de estratificação dos pacientes de LLC, de acordo com as anomalias nas contagens do sangue, sintomas relacionados com a doença e alargamento dos nódulos linfáticos, baço e fígado;</li> <li>▪ Caracterização da LLC como uma acumulação de linfócitos funcionalmente incompetentes, em vez da proliferação anómala dessas células.</li> </ul>
Hansen	1973	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Apresentação das características clínicas de 189 pacientes com LLC tratados numa instituição da Dinamarca.</li> </ul>

### **3.4.3. Incidências e variantes da LLC**

A leucemia linfocítica crónica pode ser dividida em duas variantes (B ou T), de acordo com o tipo de linfócitos envolvidos. A LLC do tipo B representa mais de 95% de todos os casos e é a forma de leucemia mais comum nos países do hemisfério Ocidental, com uma incidência de 5 casos por 100.000 residentes anualmente (segundo [2]). Afecta sobretudo pessoas idosas (idade média ao diagnóstico: 64 anos) e a sua incidência aumenta com a idade, sendo raramente diagnosticada em indivíduos com idade inferior a 30 anos. A razão entre pacientes do sexo masculino e feminino é de 2:1, aproximadamente. [1; 2; 42; 43; 44]

### **3.4.4. Aspectos clínicos e imunofenótipo da LLC-B**

Pode ser definida como uma doença monoclonal caracterizada pela acumulação de linfócitos B maduros na medula óssea, sangue, nódulos linfáticos e outros órgãos, principalmente do sistema linfático. Esta acumulação durante o decurso da doença levará, gradualmente, à supressão da hematopoiese normal e à falha de funções de alguns órgãos e, devido ao excesso de células B, os pacientes com LLC-B têm um risco agravado de desenvolvimento de infecções bacterianas. [39; 45; 46]

A nível morfológico, os linfócitos B são aparentemente maduros, pequenos, redondos, monomórficos e têm um tempo médio de vida mais longo que o normal, devido à desregulação dos mecanismos da apoptose. [39; 45]

Uma propriedade que identifica as células B da LLC é o seu imunofenótipo característico, que consiste na coexpressão dos marcadores CD5 e CD23, negatividade

para as moléculas CD22 e FMC7<sup>6</sup> e fraca expressão das imunoglobulinas de superfície (normalmente do isotipo IgM ou IgM/IgD) com restrição da cadeia leve –  $\kappa$  (60% dos casos de LLC-B) ou  $\lambda$  (40% dos casos de LLC-B). Os marcadores CD19, CD24 e CD79a, típicos de células B são expressos a níveis normais, enquanto que as moléculas CD20 e CD79b, também característicos destes linfócitos, são expressos a baixos níveis. [2; 38; 43; 44]

### 3.4.5. Estádios da LLC-B

A partir do final da década de 60, iniciaram-se diversos estudos que permitiram detectar alguns factores<sup>7</sup> que podem auxiliar no prognóstico dos pacientes. [7; 46]

A importância específica de cada um destes factores permaneceu incerta até que Rai *et al* e Binet *et al* propuseram a divisão da doença em estádios. O desenvolvimento destes sistemas permitiu a distribuição dos pacientes com diferentes factores de risco e o planeamento de uma estratégia terapêutica, levando a um avanço significativo na compreensão do prognóstico da LLC-B. [46]

O sistema de Rai (1975) agrupa os pacientes de LLC-B em cinco estádios:

- **Estádio 0** – linfocitose (sobrevivência média de 15 anos);
- **Estádio I** – linfocitose e linfadenopatia (sobrevivência média de 9 anos);
- **Estádio II** – linfocitose e alargamento do baço e/ou fígado (sobrevivência média de 5 anos);
- **Estádio III** - linfocitose e nível de hemoglobina inferior a 11g/dL (sobrevivência média de 2 anos);

---

<sup>6</sup> **FMC7** – O anticorpo FMC7, descrito em 1981, detecta um epítipo de um antígeno expresso nas células B maduras dos humanos (CD20). É usado em análises imunofenotípicas e diagnóstico diferencial de linfomas e leucemias. [48]

<sup>7</sup> **Factores de prognóstico** – Alguns marcadores biológicos têm sido associados a formas mais ou menos agressivas de LLC-B, com implicações no prognóstico, incluindo: tempo de duplicação dos linfócitos, alterações genéticas, expressão de CD38, ausência de mutações nos genes para a cadeia pesada das imunoglobulinas, expressão de ZAP-70, estádios da doença, idade, sexo, linfocitose periférica, histologia da medula óssea, alargamento dos nódulos linfáticos e baço, anemia e trombocitopenia. [7; 56]



- **Estádio IV** – linfocitose e contagem de plaquetas inferior a  $100 \times 10^9/L$  (sobrevivência média de 2 anos). [7; 33; 47]

Este sistema foi validado por vários investigadores e modificado em 1987, levando à redução dos cinco estádios originais para apenas três. Sendo assim:

- **Estádio 0 (risco baixo)** – associado a um bom prognóstico (sobrevivência média superior a 10 anos); caracterizado apenas pela presença de linfocitose no sangue e medula óssea e ausência de anemia e/ou trombocitopenia;
- **Estádios I e II (risco intermédio)** – associados a um prognóstico intermédio (sobrevivência média de 7 anos); caracterizados por hiperlinfocitose, além de nódulos linfáticos alargados e/ou hepatomegalia, ou esplenomegalia, ou ambos; ausência de anemia e/ou trombocitopenia;
- **Estádios III e IV (risco elevado)** – associados a um fraco prognóstico (sobrevivência média de 1,5 anos); caracterizados por linfocitose, anemia e/ou trombocitopenia; os nódulos, baço ou fígado podem estar ou não inchados. [7; 43; 46]

O sistema proposto por Binet, em 1977 e apresentado em 1981, distingue três grupos com diferentes prognósticos, de acordo com o número de áreas do sistema linfático envolvidas e presença/ausência de anemia e trombocitopenia:

- **Estádio A** – associado a bom prognóstico; caracterizado pelo envolvimento de menos de três áreas linfóides (estas áreas incluem os nódulos linfáticos cervicais, axilares e inguinais (quer uni- quer bilaterais), o baço e o fígado) e ausência de anemia e trombocitopenia (sobrevivência média de 12,5 anos);
- **Estádio B** – pelo menos três áreas linfóides envolvidas e ausência de anemia ou trombocitopenia (sobrevivência média de 5 anos);
- **Estádio C** – anemia e/ou trombocitopenia (independentemente do número de áreas do sistema linfático envolvidas) (sobrevivência média de 2 anos). [7; 33; 43; 46; 47]

Posteriormente, em 1988, Binet definiu sub-estádios do seu sistema de maneira a integrá-los no sistema de Rai:

- Risco baixo
  - Estádio A (Estádio 0)
  - Estádio A (Estádio I)
  - Estádio A (Estádio II)
- Risco intermédio
  - Estádio B (Estádio I)
  - Estádio B (Estádio II)
- Risco elevado
  - Estádio C (Estádio III)
  - Estádio C (Estádio IV)

No entanto, a maioria dos investigadores não está de acordo com esta classificação, continuando a adoptar um dos dois sistemas, mas não a sua combinação. [7; 33; 43]

#### **3.4.6. LLC-B atípica**

A presença de prolinfócitos em pacientes com LLC-B e a observação de que esta característica estava normalmente associada a um prognóstico negativo, levou o grupo FAB a sugerir, em 1989, a divisão da LLC-B em três variantes, a típica (menos de 10% de linfócitos atípicos), a LLC com mistura celular e a atípica (LLC/PLL e B-PLL):

- LLC com mistura celular (*mixed cell type*) – com populações de linfócitos pequenos a grandes, com prolinfócitos ocasionais (menos de 10%);
- LLC/PLL (de *Prolymphocytic Leukaemia*) – com mistura das células típicas da LLC e prolinfócitos (representam cerca de 10-55% das células em circulação);
- B-PLL – mais de 55% de prolinfócitos circulantes. [43; 46; 49]

Estes subtipos são caracterizados por diferenças clínicas e prognósticas. Segundo os estudos de Criel, A. *et al* (1997), Oscier, D. G. *et al* (1997) e Lens, D. *et al* (1997), os casos de LLC-B atípicos têm tendência a serem diagnosticados em estádios clínicos avançados, a serem mais agressivos, com necessidade de tratamento antecipado e curta sobrevivência. Além disso, anomalias como a trissomia do cromossoma 12 e do P53 podem ser mais comuns nestes casos. [43; 49]

A classificação dos subtipos de LLC deve ter em conta o imunofenótipo da superfície da célula, anomalias citogenéticas, expressão de marcadores celulares ou estágio. [49]

### **3.4.7. Factores de risco**

Esta neoplasia tem como característica o aumento do factor de risco para o seu desenvolvimento se se verificar algum caso de LLC ou outra doença linfoproliferativa no histórico familiar de um indivíduo, sendo duas a sete vezes maior para familiares em primeiro grau. Os factores responsáveis por tal facto, sejam eles genéticos, familiares, ambientais ou a sua combinação, continuam por esclarecer. [1; 43; 44; 49]

A progressão das técnicas de cultura celular e de biologia molecular, tem permitido um acréscimo acentuado no conhecimento da LLC-B, contudo, a patogénese desta neoplasia, assim como os mecanismos biológicos que a regem permanecem ainda desconhecidos. [49]

### **3.4.8. Patogénese**

Desde que a LLC-B foi reconhecida como uma entidade clínica distinta que se tem especulado acerca dos mecanismos envolvidos na sua patogenia. Tem-se verificado um interesse crescente no estudo da expressão dos genes para a região variável das imunoglobulinas (IgV) e da estrutura do receptor das células B codificado por estes genes, uma vez que se acredita que a ligação do antigénio a este receptor, e consequente estimulação da célula B, possam ser mecanismos relevantes para a formação das células malignas. [36]

Nos primeiros estudos acerca da LLC-B, tendo em conta o fenótipo da superfície membranar (IgM<sup>+</sup>/IgD<sup>+</sup>) e a aparente ausência de mutações dos genes IgV, pensava-se que as células da LLC-B derivavam de células B virgens que nunca teriam contactado com um antigénio. Contudo, segundo vários trabalhos, verificou-se que cerca de metade dos casos de LLC-B apresentam mutações somáticas nesses genes. Com base nestes dados, pode considerar-se a existência de dois grupos diferentes de LLC-B:

- um com genes para a região variável da cadeia pesada das Ig (V<sub>H</sub>) mutados;
- um outro com genes V<sub>H</sub> não mutados. [2; 32; 36]

No caso do primeiro grupo (genes V<sub>H</sub> mutados), as células malignas derivam de células B que foram estimuladas por antigénios e passaram pelas reacções dos centros germinativos dos órgãos linfóides secundários, acumulando mutações nos genes IgV<sub>H</sub>. [33; 36; 43]

Em relação ao segundo grupo (genes  $V_H$  não mutados), há algumas teorias que tentam explicar o facto das células B não possuírem mutações:

- Segundo alguns autores, tratam-se de células que derivam de linfócitos B *naïve* ou de linfócitos que, embora estimulados por antígenos, não entraram no centro germinativo e não acumularam mutações. [33; 43]
- Outros investigadores defendem que estas células malignas derivam de linfócitos B activados por antígenos e a ausência de mutações pode ser explicada pelo facto da transformação em células tumorais ter ocorrido antes de eles atingirem os centros germinativos; ou os antígenos responsáveis pela activação das células B das quais derivam eram independentes de células T ou eram auto-antígenos, que normalmente, não conseguem desencadear as reacções dos centros germinativos e consequentes mutações nos genes  $IgV_H$ . [33; 36; 43]

Quanto ao possível envolvimento da ligação do antígeno ao receptor das células B, pode deduzir-se que, se este mecanismo for o responsável pela transformação dos linfócitos B em células malignas, mais uma vez se apoia a hipótese de que a célula B que sofre transformação maligna será imunocompetente pois, caso contrário, não seria capaz de converter e responder aos sinais recebidos pelo seu receptor. Além disso, a activação do linfócito B pelo antígeno que, eventualmente, desencadeia a transformação em célula B maligna poderá ocorrer num determinado estágio de maturação em específico. [36]

A expressão do receptor das células B está diminuída nos casos de LLC-B. Em 1997 propôs-se uma explicação para este facto: Thompson, A. *et al* sugeriram que a ocorrência de mutações somáticas no gene para o marcador CD79b parecia afectar a sua expressão, no entanto, outros investigadores não conseguiram identificar mutações neste mesmo gene. Outro mecanismo que pode explicar esta situação consiste no *splicing* alternativo do gene para o marcador CD79b que leva à codificação de outra forma desta proteína que não a normal. Esta variante alternativa foi detectada em todos os casos de LLC-B analisados por Alfaro, A. *et al* (1999) sugerindo que é o *splicing* alternativo deste gene que causa a expressão reduzida do receptor das células B na superfície destes linfócitos na LLC-B. [39; 45]

Por fim, se a LLC-B é uma doença dos linfócitos B que reagem com uma gama restrita de antígenos ou apenas com algum em específico, estudar a estrutura do receptor B e

dos genes que o codificam pode fornecer informações cruciais acerca da natureza e identidade do antigénio. Até hoje, houve apenas um caso nas Caraíbas que sugere o envolvimento de um agente infeccioso (HTLV-1) na LLC-B. Sugeriu-se que o vírus, ou as proteínas expressas por ele, poderão ter sido seleccionadas pelo receptor das células B, transformando-as directamente ou actuando como estímulos antigénicos de modo a induzir aquelas células B a se transformarem em células malignas. [36]

#### **3.4.9. Anomalias genéticas da LLC-B**

Até ao início da década de 1970, empregava-se o mitogénio fitohemaglutinina (PHA), específico para activação das células T, para obtenção de metafases de boa qualidade. Como este linfócito não está envolvido na patogénese desta doença, todos os clones de LLC-B analisados eram normais, não havendo por esta altura nenhuma anomalia associada à doença. Os primeiros relatos de anomalias cromossómicas na LLC-B, detectadas através de bandeamento dos cromossomas, remontam ao início dos anos 80, tendo sido a trissomia do cromossoma 12 a primeira a ser descrita, seguindo-se a deleção do braço longo do cromossoma 13 (final de 1980). Desde então, muitas outras se têm descoberto. [33; 43; 50; 51; 52; 53]

Embora se utilizem mitogéneos (TPA, lipopolissacarídeos, *pokeweed*, factor de crescimento das células B, entre outros) direccionados para as células B desde a década de 80 e se tenham optimizado as técnicas de cultura celular, as anomalias são detectadas em apenas 40-50% dos casos, aproximadamente, devido ao facto das células malignas terem um baixo índice mitótico *in vitro*, dificultando os estudos por citogenética clássica, sendo que as metafases normais são habitualmente de linfócitos T não leucémicos. Por esta razão, o estudo de cada amostra não pode ser limitado à análise de metafases, uma vez que não é representativo do perfil genético das células B malignas. [50; 51]

Os dados adquiridos no mais amplo estudo envolvendo métodos de citogenética clássica foram apresentados em 1990 e 1991, na Primeira e Segunda Reunião Internacional de Trabalhos sobre Cromossomas na LLC (*International Working Party on Chromosomes in CLL - IWCCLL*), sendo que no Segundo IWCCLL se estabeleceram as seguintes frequências para as alterações cromossómicas mais frequentemente identificadas neste tipo de leucemia: trissomia do cromossoma 12 (19% dos casos),

delecções e, embora menos frequentemente, translocações envolvendo o cromossoma 13q14 (10%) e delecções do 11q22-q23 (8%), 6q21 (6%) e 17p13 (4%). As translocações são raras na LLC-B, mas podem surgir por vezes, e normalmente, envolvem o *locus* para a cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) localizado no cromossoma 14q32 (8% dos casos). Este ponto de quebra está envolvido, habitualmente, em rearranjos característicos de linfomas do manto e não de LLC-B. [43; 51; 52; 53; 54]

Nestas reuniões, também se estabeleceu a relação entre as anomalias cromossómicas detectadas por citogenética convencional e parâmetros clínicos aquando da avaliação dos pacientes com LLC-B. Um cariótipo normal foi associado a maior sobrevivência ( $\approx$  15 anos) quando comparado com um cariótipo com anomalias clonais (7,7 anos em média). De entre os pacientes com anomalias, os que sofriam de alterações cromossómicas complexas apresentavam uma taxa de sobrevivência inferior em relação aos doentes com uma só alteração. [50; 52; 53]

O desenvolvimento de novas técnicas de genética molecular no final de 1980/início de 1990, nomeadamente a FISH, vieram prestar um grande contributo para o estudo da LLC-B, permitindo a detecção de anomalias em 80% dos casos. A aplicação de FISH em amostras de diversos pacientes com LLC-B veio demonstrar que as taxas de incidência de algumas das anomalias genéticas detectadas por métodos convencionais eram subvalorizadas. Assim, e segundo a FISH, a anomalia mais comum é a delecção do 13q14 ( $\approx$  50% casos), seguida da delecção do 11q22-q23 ( $\approx$  20% casos), trissomia do cromossoma 12 (15-20%) e delecções do 6q21 (5-10%) e do 17p13 (5-10%). [50; 51]

As discrepâncias detectadas entre estudos que envolvam técnicas de bandeamento e os que envolvam a técnica FISH, podem dever-se, de algum modo, a diferenças nos pacientes seleccionados para cada estudo, mas são devidas sobretudo à diferença entre o grau de sensibilidade e a resolução de ambas as técnicas. Enquanto que pela citogenética convencional só é possível detectar anomalias bem visíveis pelo padrão de bandas, a genética molecular permite identificar alterações subtis. Além disso, o diagnóstico das alterações genéticas por métodos moleculares não está limitado apenas à observação de metafases, podendo ser detectadas também em células que não se encontrem em divisão (*interphase* FISH). Contudo, e tendo em conta a escassez de conhecimentos em relação aos genes envolvidos nesta patologia, de modo a produzir



sondas dirigidas aos mesmos, esta técnica pode ser considerada como um poderoso complemento ao estudo citogenético clássico, mas não como seu substituto. [50; 51; 52]

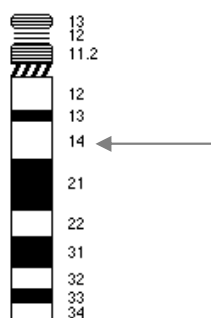
Uma vez que certas anomalias genéticas são observadas repetidamente na LLC-B, deduz-se que estes genes desempenhem um papel preponderante nesta doença. Actualmente, sugere-se que algumas destas alterações estarão envolvidas na patogénese da LLC-B, enquanto que outras contribuirão para a sua progressão. [54]

#### 3.4.9.1. Delecção do 13q14

Alterações estruturais envolvendo o braço longo deste cromossoma foram inicialmente descritas no final de 1980, envolvendo métodos de citogenética clássica. Destas alterações, muitas tratavam-se de delecções envolvendo a banda 13q14 (**Figura 8**), enquanto outras apareciam como translocações equilibradas, segundo era permitido visualizar pelo poder de resolução das metafases obtidas. Contudo, através de comprovação por técnicas de genética molecular, verificou-se que muitas destas translocações eram acompanhadas por delecções submicroscópicas. [50; 51; 52; 53; 54]

Em trabalhos recentes demonstrou-se que esta delecção é a anomalia genética que predomina, sendo detectável em cerca de metade dos casos. [51; 54]

Normalmente assume-se que regiões que envolvam delecções suportam genes supressores tumorais, que por delecção de um alelo e mutação da cópia restante são inactivados. Um gene supressor tumoral localizado nesta banda e que é um forte candidato a desempenhar um papel na patogenia da LLC-B é o gene do Retinoblastoma



1 (RB1). O RB1 codifica uma fosfoproteína nuclear responsável pelo controlo do ciclo celular e da regulação da transcrição. Através de técnicas moleculares, verificou-se que eram frequentes as delecções monoalélicas deste gene, no entanto, anomalias que envolvam ambos os alelos são raramente detectadas. Além disso, não foram descritos

**Figura 8** – Ideograma do cromossoma 13, com a seta evidenciando a banda q14 (adaptado de [91])

para a investigação de outros genes supressores. [2; 50; 51]

Tendo em conta que as translocações recíprocas envolvendo a banda 13q14 eram mais frequentemente associadas com deleções do marcador D13S25, posicionado telomericamente (distal) em relação ao RB1, postulou-se que um novo gene, denominado DBM (de *Disrupted in B cell Malignancies*) e localizado na vizinhança deste marcador, seria o gene procurado. Vários estudos moleculares se seguiram com o objectivo de identificar precisamente a sua localização, através da construção de mapas físicos de alta resolução que abrangiam o intervalo compreendido entre RB1-D13S25. Várias hipóteses de localização do gene foram colocadas, como a região de aproximadamente 300 Kb, circundante ao marcador D13S272, detectada por Kalachikov *et al* (1997), e cuja deleção foi observada em 54% dos pacientes de LLC-B testados, sendo frequentemente homozigóticos. Posteriormente, e a partir desta mesma região, outra sequência foi identificada, por Liu *et al* (1997), a região centromérica ao D13S272, onde se localizavam dois genes candidatos: LEU1 (denominação actual: BCMS) e LEU2 (denominação actual: BCMSUN). No entanto, não se comprovou a inactivação dos mesmos por mutação. Também Rai e Wasil (2001) isolaram fragmentos de DNA desta região, denominados de ep272-3-t5 e ep272-3-t4, correspondentes aos genes LEU1 e LEU2, e não verificaram disrupção da sua função por mutação. [50; 51; 52; 54]

Foi levantada a hipótese, através de um estudo desenvolvido por Garcia-Marco *et al* (1996), do envolvimento do gene BRCA2 localizado na região 13q12, contudo, em estudos subsequentes (Panayiotidis *et al*, 1997), não foram observadas deleções recorrentes deste gene. Portanto, a investigação do gene supressor tumoral envolvido na LLC-B e localizado na banda 13q14 está ainda em decurso. [50; 52; 53; 54]

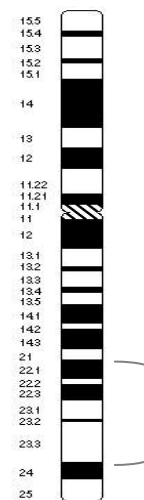
Em relação ao significado clínico desta deleção, e de acordo com as conclusões a que se chegou no Primeiro e Segundo IWCCLL, os pacientes com anomalias estruturais no cromossoma 13 têm um prognóstico mais favorável em relação a todas as outras mutações, com probabilidade de sobrevivência similares às de um indivíduo de cariótipo normal. [50; 51; 53]



### 3.4.9.2. Delecção do 11q22-q23

Na maioria dos estudos por bandeamento de cromossomas, a frequência das alterações do 11q22-q23 (**Figura 9**) foi subestimada, representando apenas 8% dos casos avaliados no Segundo IWCCLL, e desta percentagem, a maioria resultava da translocação t(11;14)(q13;q32), que hoje em dia, é considerada rara na LLC-B e tipicamente associada a linfomas do manto. [50; 51]

A relevância do papel da delecção do 11q no prognóstico deve-se principalmente a dois estudos (Neilson *et al* (1997) e Döhner *et al* (1997)) de citogenética convencional. Num dos relatos, esta anomalia foi a segunda mais comum, após a delecção do 13q, e adquiriu importância diagnóstica ao identificar um grupo de pacientes mais jovem, em estágio de Rai mais avançado, com progressão rápida da doença, curta sobrevivência e linfadenopatia extensiva. O impacto deste prognóstico parece ser mais notável em doentes jovens ( $\leq 55$  anos). [50; 51; 54]



**Figura 9** – Ideograma do cromossoma 11, com a chaveta evidenciando a região q22-23 (adaptado de [92])

No que toca à caracterização molecular da região crítica afectada pelas delecções do braço longo do cromossoma 11, até recentemente muito pouca informação estava disponível. Num estudo por FISH de diversas neoplasias hematológicas foi identificado um segmento que sofre delecção comumente, situado na região 11q23.1, e que contém o gene para a molécula de adesão das células neurais (NCAM), enquanto que os *loci* para os genes BCL1 (11q13) e MLL (11q23.3) se situam exteriormente a esta região crítica. [50; 51; 53]

Para definir o *locus* afectado pelas delecções do 11q nos casos de LLC-B, Stilgenbauer *et al* (1996) aplicaram a técnica FISH a quarenta amostras com esta doença, com sondas complementares ao intervalo compreendido entre as bandas 11q14.3-q23.3. Todas as delecções afectaram uma região de 2 a 3 Mb localizada entre

as bandas 11q14.3-q23.3. Esta descoberta foi confirmada mais tarde por outro grupo (Zhu *et al*, (1999)). [50; 51; 54]

De entre os genes localizados nessa região, o RDX (*radixin*) e o ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) pareciam ser promissores candidatos a genes supressores tumorais, tendo em conta as suas funções. O RDX codifica uma proteína do citosqueleto de função desconhecida, que apresenta homologia com o gene da neurofibromatose do tipo 2 (NF2), enquanto que o ATM contribui para o controlo do ciclo celular e manutenção do DNA. Além destas evidências, foram descritas deleções e outras mutações que causavam disrupção de ambos os alelos do ATM em casos de leucemia prolinfocítica T, revelando uma função de supressão tumoral deste gene. Levantou-se a hipótese de que o ATM pode estar afectado na LLC-B, tendo como base a observação da ausência de expressão da proteína atm em conjuntos de pacientes com esta patologia, e de facto, foi comprovada a disrupção deste gene por mutação (Starostik, P. *et al*, (1998); Bullrich, F. *et al*, (1999); Stankovic, T. *et al*, (1999); Schaffner, C. *et al*, (1999)). [52; 53; 54]

Foi sugerido por Pettitt *et al* (2001) que a perda da função da proteína codificada pelo gene ATM durante a maturação das células B pode levar ao desencadeamento da transformação das células normais em células tumorais, devido à acção que esta desempenha sobre a proteína p53 que, por sua vez, responde a danos no DNA e repara pontos de quebra entre cromossomas. [2; 51]

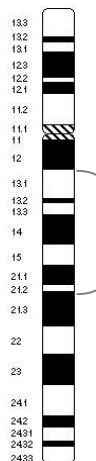
A deleção do 11q22-q23 foi identificada recentemente como uma anomalia frequente de linfomas do manto, contudo a investigação por genes presentes nesta região e envolvidos na LLC-B está ainda em decurso. [50; 51]

### **3.4.9.3. Trissomia do cromossoma 12**

Como referido anteriormente, esta anomalia foi a primeira descrita, no início da década de 1980, como alteração cromossómica recorrente da LLC-B. Em estudos posteriores por citogenética clássica, a sua predominância foi confirmada, sendo considerada nos primeiros relatos como a anomalia mais frequente da LLC-B. [50; 51; 53; 54]

Foi comprovado que a trissomia do cromossoma 12 resulta da duplicação de um homólogo em vez da perda de um homólogo e triplicação do cromossoma restante. Poucos casos com trissomia parcial do cromossoma 12 foram descritos, daí o escasso conhecimento sobre o segmento crítico do cromossoma 12 que contém os genes de

potencial relevância para a LLC-B. Normalmente, o segmento duplicado corresponde, no mínimo, às bandas 12q13-q21.2 (**Figura 10**), apontando a possibilidade de localização de um oncogene nesta região que desempenhe um papel preponderante nesta neoplasia. Um gene hipotético é o MDM2, o homólogo humano do gene “*mouse double minute 2*”, cuja proteína se liga à proteína p53, promovendo a degradação da última. [45; 50; 51; 54]



**Figura 10** – Ideograma do cromossoma 12, com a chaveta evidenciando a região q13-q21.2 (adaptado de [92])

Num outro estudo, levado a cabo por Merup *et al* (1997), foi analisado um rearranjo complexo envolvendo este cromossoma, detectado por FISH num tumor linfoproliferativo, indicando que as bandas 12q13-q15 eram as mais frequentemente amplificadas. [50; 51]

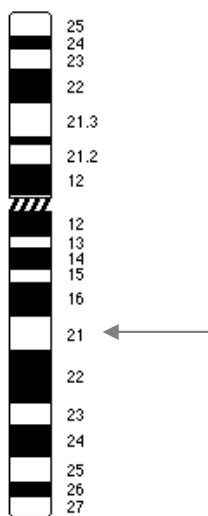
Vários grupos de investigadores avaliaram esta alteração genética por FISH, determinando vários valores para a sua incidência, desde 10 a 20% em estudos europeus e mais de 30% em dois estudos americanos. Esta variação pode dever-se à selecção dos pacientes, ou pode estar relacionada, de algum modo, com a distribuição geográfica desta anomalia. [50; 51; 52]

Quanto ao impacto desta alteração cromossómica no prognóstico, Escudier *et al* (1993) realizaram a pesquisa de trissomia do cromossoma 12, por citogenética convencional e FISH, em oitenta e três pacientes com LLC-B. Deste estudo denotou-se que a sobrevivência dos portadores desta trissomia era significativamente mais curta (7,8 anos) que a dos doentes com cariótipo diplóide (14,4 anos). Verificou-se também que os pacientes com alterações no cromossoma 12, normalmente, encontram-se em estádios

de Binet mais avançados e requerem um pré-tratamento mais forte. Além disso, como se deduziu através de dados obtidos por técnicas moleculares, a trissomia do cromossoma 12 está fortemente associada ao aumento do número de linfócitos atípicos (com diâmetro maior, forma menos arredondada e cromatina mais heterogénea que os linfócitos normais) ou prolinfócitos entre as células leucémicas e, frequentemente, com um imunofenótipo atípico. [50; 51; 52; 53]

#### 3.4.9.4. Delecção do 6q21

Anomalias envolvendo o braço longo do cromossoma 6 são frequentemente observadas em neoplasmas linfóides. No Segundo IWCCLL, as delecções do 6q foram detectadas em 6% dos casos analisáveis e as bandas 6q15 e 6q23 eram as comumente envolvidas. Delecções ou translocações no braço curto do cromossoma 6 (6p) também já foram descritas em casos de LLC-B, mas com uma incidência inferior às do 6q. [45; 50; 51; 52; 53]



**Figura 11** – Ideograma do cromossoma 6, com a seta evidenciando a região q21 (adaptado de [91])

Várias análises moleculares a diversos subtipos de linfomas malignos foram feitas, na tentativa de delinear a região envolvida, e pelo menos duas regiões foram identificadas: 6q21-q23 e 6q25-q27. A delecção da primeira região foi associada ao pequeno linfoma linfocítico (SLL). [50; 51; 53]

Outras investigações se seguiram, nomeadamente: Gaidano *et al* (1994) que detectaram delecções do 6q em apenas 4% dos casos de LLC-B em estudo, mas como as sondas empregues eram complementares à banda 6q27, leva a deduzir que este não será o segmento envolvido mais frequentemente na LLC-B; Merup *et al* (1998) que descobriram delecções do braço longo do cromossoma 6 em 6% dos casos de LLC-B estudados, numa região compreendida entre os marcadores D6S283 e D6S270, localizados na banda 6q21 (**Figura 11**); no estudo realizado por Stilgenbauer *et al* (1999) foram usadas sondas para as regiões 6q21 e 6q27: foram detectadas delecções do 6q em

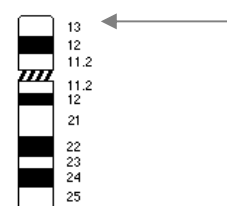
7% dos casos analisados, sendo que em todas estas amostras foi identificada a mutação na região 6q21, enquanto que, em apenas um terço delas foi detectada a deleção da banda q27; por fim, Zhang *et al* (2000) determinaram uma região de deleção com 4 a 5 Mb na banda 6q21 numa vasta gama de linfomas e leucemias linfóides. Vários genes foram já identificados nesta região (TNF1, por exemplo), no entanto, ainda não foi comprovado o envolvimento de nenhum deles na LLC-B. [2; 50; 51; 53]

Quando detectada em casos de linfomas foliculares *non-Hodgkin*, esta deleção tem um prognóstico negativo, no entanto, e de acordo com os estudos apresentados nos Primeiro e Segundo IWCCLL, não se identificou nenhum efeito desta anomalia no prognóstico da LLC-B. Segundo Stilgenbauer, S. *et al* (1999), a deleção do 6q foi associada a maior massa tumoral (medida pelo aumento do número de glóbulos brancos) e linfadenopatia mais alargada, mas não necessariamente a prognóstico inferior. [50; 51]

#### 3.4.9.5. Deleção do 17p13

Tendo em conta o papel preponderante do gene supressor tumoral P53, localizado na banda 17p13 (**Figura 12**), na patogénese de vários tipos de cancro, estudou-se a possibilidade do mesmo gene, responsável pela regulação do ciclo celular e apoptose celular, estar envolvido nas anomalias do 17p observadas pouco frequentemente na LLC-B por bandeamento de cromossomas. [50; 51]

Vários estudos foram realizados por diversos investigadores, salientando Gaidano *et al* (1991), Döhner *et al* (1995), Döhner *et al* (1997), entre outros. As frequências desta mutação variam de estudo para estudo, em parte devido à selecção de pacientes, em especial nos projectos dirigidos por Döhner, em que a diferença se deve ao facto de no segundo só terem sido incluídos casos com morfologia e imunofenótipo típico de LLC-B clássica, enquanto que no primeiro, além desses, também constavam outros síndromes linfoproliferativos. [50; 51; 52]



**Figura 12** – Ideograma do cromossoma 17, com a seta evidenciando a região para o gene p53 (adaptado de [91])

Assim, na LLC-B clássica, o gene P53 parece perder função por deleção ou mutação em aproximadamente 9% a 15% dos casos, conforme detectado por FISH ou sequenciação de DNA. [50; 53]

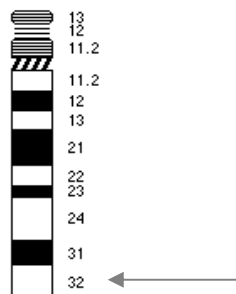
Até muito recentemente, o P53 era o único gene que aparentava estar envolvido na patogénia da LLC-B. É de salientar que as mutações do gene ATM, encontradas num grupo de pacientes com deleção do 11q, também podem resultar na disfunção da via regulada pela p53, responsável pela reparação do DNA. A proteína codificada pelo gene ATM pode activar a proteína secretada pelo gene P53, através da fosforilação de resíduos específicos de serina da última. Uma vez que a actividade da proteína p53 é influenciada pela actividade cinase da proteína segregada pelo gene ATM, as mutações neste último gene também podem desencadear a disfunção da via que envolve a proteína p53. [47; 51; 54]

O forte impacto prognóstico das anomalias do gene P53 foi demonstrado num estudo desenvolvido por El-Rouby *et al* (1993) que mostrou que esta alteração indicava falha do tratamento dos pacientes com análogos de purina. No estudo levado a cabo por Döhner e seus colaboradores, em 1995, verificou-se que os pacientes com deleção do P53 tinham um tempo de sobrevivência mais curto que os pacientes sem a mesma e também o tratamento com agentes alquilantes não funcionava. Outras análises revelaram que esta deleção é o factor de prognóstico mais forte para a sobrevivência. [50; 51; 52; 53; 54]

#### **3.4.9.6. Rearranjos do 14q32**

As translocações envolvendo o cromossoma 14, em especial a banda q32 que alberga os segmentos genéticos codificadores da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH), e que levam à formação de um cromossoma “14q+”, foram frequentemente relatadas em estudos de citogenética clássica de amostras de LLC-B. A maioria destes rearranjos consiste na t(11;14)(q13;q32) (**Figura 13**), que causa a fusão do gene BCL1 na banda 11q13 com o *locus* para IgH no cromossoma 14q32. Contudo, embora no Segundo IWCCLL se tivesse considerado esta anomalia em 8% dos casos avaliados, veio a comprovar-se, mais tarde, que estes não se tratavam de pacientes com LLC-B, mas sim com linfoma do manto. Portanto, esta translocação, hoje em dia, está associada

precisamente ao linfoma do manto, mas também pode ocorrer invulgarmente em doenças linfoproliferativas que não a LLC-B clássica. [50; 52; 53]



**Figura 13** – Ideograma do cromossoma 14, com a seta evidenciando a banda q32 (adaptado de [91])

Também se sugeriu o envolvimento do gene BCL2 na LLC-B. A translocação  $t(14;18)(q32;q21)$  é considerada característica do linfoma folicular *non-Hodgkin*, mas a sobreexpressão de BCL2 sem ocorrência da translocação  $t(14;18)$  é, por vezes, observada em outras neoplasias como a LLC-B e a sua sobreexpressão pode proteger as células B malignas de sinais pró-apoptóticos. No linfoma folicular *non-Hodgkin*, os pontos de quebra da translocação  $t(14;18)(q32;q21)$  estão localizados na região mbr (*major breakpoint region*) (**Figura 14**) ou na região mcr (*minor cluster region*) na porção 3' do BCL2, enquanto que os pontos de quebra observados em alguns casos de LLC-B foram localizados na porção 5' do BCL2. Em estudos de um grande número de amostras de LLC-B clássica por genética molecular, os rearranjos do BCL2 são raros. [50; 51; 53]





**Figura 14** – Representação esquemática da estrutura do gene BCL2, evidenciando a localização das regiões mbr e mcr (adaptado de [55])

Outro rearranjo possível é a  $t(14;19)(q32;q13)$ , embora de baixa frequência, mas recorrente, em síndromes linfoproliferativas. Do ponto de quebra 19q13 foi clonado o gene BCL3 que codifica uma proteína coactivadora da transcrição. Sendo assim, rearranjos do *locus* para IgH na banda 14q32 com proto-oncogenes do tipo BCL parecem ser raros na LLC-B. [50; 51; 52; 53]

As translocações envolvendo a banda 14q32 estavam largamente associadas a baixa sobrevivência, segundo os primeiros estudos citogenéticos. No Primeiro IWCCLL, os pacientes com o *marker* “14q+”, que era observado recorrentemente nos primeiros estudos de LLC-B por citogenética clássica, possuíam taxas de sobrevivência mais baixas que as dos pacientes com trissomia do cromossoma 12. Contudo, a translocação recíproca  $t(11;14)(q13;q32)$  está, actualmente, associada ao linfoma do manto e não é frequente na LLC-B. [50; 53]

#### 3.4.9.7. Outras anomalias

Outras alterações cromossómicas pouco frequentes, mas recorrentes, na LLC-B foram detectadas por bandeamento cromossómico e CGH, tais como ganhos de material extra, como a trissomia do cromossoma 3. Os dados adquiridos por citogenética clássica e molecular sugerem que o segmento duplicado compreende, no mínimo, a região distal do braço longo, podendo conter um *locus* para um oncogene com importância patogénica na LLC-B. Além desta anomalia, também se verificou a existência de ganhos de material no 8q e 15q. Análises preliminares de amostras com LLC-B identificaram ganhos adicionais nas bandas 2q22, 7q31 e 11q25. [2; 50; 51; 53]



Apesar de ganhos de material extra, além da trissomia do cromossoma 12, serem raros na LLC-B, é de salientar um estudo desenvolvido por Oscier, D. G. *et al* (1997) com cento e vinte casos de trissomia 12. Destes, doze pacientes tinham trissomias múltiplas, praticamente todos com trissomia do cromossoma 19 e alguns com trissomia do cromossoma 18. Levantam-se as hipóteses de estes doentes serem particularmente predispostos a aneuploidias ou, de a aquisição de trissomia do cromossoma 12 poder aumentar o risco de estes doentes desenvolverem trissomias adicionais. Segundo dados obtidos pela FISH, realizada a amostras provenientes destes pacientes, a trissomia do 12 parece ter sido o acontecimento inicial. [54]

Procedeu-se, também, à investigação do envolvimento de genes do cancro como é o caso da p16 (expressa pelo gene CDKN2A) localizado na banda 9p21, que está comumente implicado em outros tipos de neoplasias, contudo na LLC-B não parece desempenhar nenhum papel. [50; 51; 53]

Devido à baixa incidência destas anomalias, os genes candidatos presentes nestas regiões permanecem por identificar.

#### **3.4.10. Estado da mutação dos genes para $V_H$ e sobrevivência/alterações cromossómicas**

Dois aspectos devem ser diferenciados no que diz respeito à análise genética da LLC-B: por um lado, as anomalias cromossómicas descritas anteriormente, alterações adquiridas que podem estar envolvidas no início e na progressão da doença; por outro lado, o estado de mutação dos segmentos genéticos para a região variável da cadeia pesada ( $V_H$ ) das imunoglobulinas que pode reflectir a origem das células da LLC-B. [2]

O estado de mutação dos genes para  $V_H$  pode ser considerado clinicamente relevante, devido à dedução de uma correlação inversa entre este parâmetro e o decurso da doença/sobrevivência. A partir dos estudos pioneiros de Damle *et al* (1999) e Hamblin *et al* (1999), que relatam a análise de cento e trinta e um doentes de LLC-B, verificou-se que os casos com 98% ou mais de homologia para os genes da  $V_H$  (isto é, genes não mutados) sofriam um decurso clínico mais agressivo, com progressão rápida da doença e períodos de sobrevivência mais curtos quando comparados com os casos de homologia inferior a 98% (genes mutados).

Dos trabalhos de Hamblin e seus colegas (1999) também foi possível concluir que o subgrupo que não apresentava mutações destes genes era mais susceptível a expressar trissomia do cromossoma 12, enquanto que as células B do subgrupo com mutações nos genes IgV<sub>H</sub> expressavam maioritariamente anomalias no *locus* 13q14. [36; 47]

Estudos subsequentes (Maloum, K. *et al.* (2000) e Thunberg, U. *et al.* (2001)) confirmaram este impacto do estado mutacional dos genes para V<sub>H</sub> na sobrevivência dos pacientes com LLC-B, contudo ainda não foi possível estabelecer uma relação uniforme entre as anomalias genéticas e a presença/ausência de mutação destes genes na LLC-B, pelo que mais investigações terão de ser realizadas para determinar o significado biológico desta descoberta. [2; 36; 50; 51]

#### **3.4.11. Estado de mutação dos genes para V<sub>H</sub> e CD38**

Também se estabeleceu uma relação inversa entre o estado de mutação dos genes para V<sub>H</sub> e a expressão do marcador CD38. CD38 é uma glicoproteína transmembranar com actividades de ADP-ribosil ciclase e ADP-ribose cíclica hidrolase, que constitui uma molécula acessória nas vias de transdução de sinais mediadas pelo receptor das células B. Nestas células, o CD38 não é um marcador indicativo da linhagem, mas é por vezes expresso durante o seu desenvolvimento. [50; 51; 56]

Os resultados de alguns estudos (Damle, J. N. *et al* (1999) e Damle, J. N. *et al* (2000)) fortificam a evidência das diferenças biológicas das duas formas de LLC-B. Segundo Damle *et al*, e tendo como base a percentagem de células clonais que expressavam CD38 na superfície das membranas, a LLC-B pode ser dividida em duas categorias: uma com <30% das células totais da LLC-B positivas para CD38 e um outro com ≥30% das células totais da LLC-B positivas para CD38. A análise deste investigador e seus colegas, mostrou que o primeiro grupo (<30% das células positivas para CD38) incluía quase exclusivamente os casos com mutações nos genes para V<sub>H</sub>, enquanto que o segundo grupo (≥30% das células positivas para CD38) compreendia os casos de LLC-B sem mutações, indicando uma relação inversa entre o estado de mutação desses genes e a expressão do CD38. Contudo, como a mesma relação não foi detectada num estudo posterior, a possibilidade de usar o CD38 como marcador para a mutação do V<sub>H</sub> é controversa. [2; 36; 50; 51]

Será de esperar que o nível de expressão desta glicoproteína (CD38) nas células B da LLC-B varie com a progressão da doença, daí o elevado risco de usar este factor para o prognóstico, principalmente nos estádios iniciais da doença. No entanto, a positividade para este marcador está associada à diminuição significativa da sobrevivência e resposta fraca ao tratamento, em especial com análogos de purina. [2; 36; 56]

Assim, o estado de mutação dos genes para IgV<sub>H</sub> e a expressão do CD38 são marcadores recentes e independentes do prognóstico da LLC-B. Como eles não se sobrepõem completamente, são necessários mais estudos comparativos de pacientes para estabelecer a sua interdependência e a sua utilidade para o oncologista determinar o decurso clínico de cada paciente. [36]

Uma vez mais, as informações anteriores sugerem que as células da LLC-B derivam de linfócitos B imunocompetentes que foram activados por antígenos específicos em alguma fase durante o seu desenvolvimento pré-leucémico e/ou, possivelmente, após transformação em células malignas. Esta hipótese baseia-se na presença de mutações nos genes para IgV<sub>H</sub>, indicativas de activação celular via receptor B e passagem pelos centros germinativos. [36]

#### **3.4.12. ZAP-70**

Recentemente, e de acordo com os resultados experimentais obtidos por Chen, L. *et al* (2002) e Wiestner, A. *et al* (2003), foi identificada a expressão da proteína de sinalização intracelular ZAP-70 (*zeta-associated protein 70*) como um marcador para o estado de mutação dos genes para IgV<sub>H</sub>. Esta proteína é normalmente expressa pelos linfócitos T e está envolvida na sua activação. Contudo, as células da LLC-B com genes para IgV<sub>H</sub> não mutados expressam níveis detectáveis de ZAP-70, enquanto que, nas células com os genes para as cadeias pesadas das imunoglobulinas mutados, esta proteína não foi detectada. Assim, a expressão da ZAP-70 parece ser o melhor indicativo do estado de mutação dos genes para IgV<sub>H</sub> e de pacientes com progressão mais rápida da doença, contudo esta correlação não é absoluta. [47; 56; 57]

### **3.4.13. Diagnóstico da LLC-B**

Em 1988, o Instituto Nacional do Cancro (NCI) publicou normas para o diagnóstico e tratamento da LLC-B, adoptadas pela maioria dos clínicos. Ao longo destes anos, e tendo em conta os avanços da tecnologia e dos conhecimentos sobre a LLC-B, estas normas foram revistas. Na grande maioria dos casos, o diagnóstico pode ser facilmente estabelecido após observação de um esfregaço de sangue periférico (de modo a verificar se se trata de LLC-B típica ou atípica) e análise dos marcadores celulares (imunofenótipo). Por vezes, também é necessário recorrer a biópsia da medula óssea para se verificarem infiltrados linfóides de acordo com os padrões associados à LLC-B (intersticial, nodular ou difuso - estando o último associado a prognóstico negativo), histologia dos nódulos linfáticos e estudos citogenéticos ou moleculares de modo a distinguir a LLC-B de outras neoplasias linfoproliferativas. [43; 60; 61]

O estabelecimento do diagnóstico da LLC-B requer critérios mínimos:

- esfregaço sanguíneo, em que os linfócitos pareçam maduros, pequenos e uniformes, com escasso citoplasma, cromatina com aspecto de “mosaico” e com menos de 55% de prolinfócitos (células maiores, com nucléolo saliente);
- linfocitose absoluta com valores superiores a 5.000/ $\mu$ l;
- no esfregaço da medula óssea deve-se observar que mais de 30% de todas as células nucleadas são linfóides;
- o imunofenótipo deve revelar uma população monoclonal, predominantemente de células B, que expressem marcadores B (CD19, CD20, CD23) em simultâneo com o CD5;
- a densidade das imunoglobulinas de superfície deve ser baixa;
- a célula B tem de ser monoclonal no que diz respeito à expressão das cadeias leves  $\kappa$  e  $\lambda$ . [43; 47; 60; 61]

### **3.4.14. Tratamento da LLC-B**

O progresso das técnicas de diagnóstico, como os métodos moleculares para detecção dos níveis de expressão de ZAP-70 e a presença/ausência de rearranjos nos genes para IgV<sub>H</sub>, auxilia a identificação de pacientes de alto risco, permitindo administrar terapia agressiva, embora não esteja provado que resulte necessariamente em aumento da taxa de sobrevivência. [56]

Uma vez diagnosticada a doença, o oncologista deve decidir se o paciente necessita de tratamento, o que se pode tornar uma árdua tarefa tendo em conta a heterogeneidade desta neoplasia. Como não existem informações que demonstrem que o tratamento precoce da LLC-B assintomática resulte em benefícios no tempo de sobrevivência, frequentemente o paciente é observado (cada 3 a 6 meses) durante alguns anos, efectuando exames físicos e avaliação hematológica, antes de se iniciar a terapêutica. Segundo o Grupo de Trabalho do Instituto Nacional de Cancro (NCIWG) o tratamento deve ser iniciado quando o paciente apresenta:

- Sintomas “B”:
  - Perda de peso superior a 10% do peso corporal em 6 meses;
  - Febre durante duas semanas;
  - Suores nocturnos;
  - Fadiga extrema;
- Anemia e/ou trombocitopenia agravada;
- Citopenias autoimunes;
- Alargamento dos nódulos linfáticos;
- Inchaço progressivo do baço;
- Linfadenopatia progressiva;
- Tempo de duplicação dos linfócitos de 6 meses. [43; 56; 60; 61]

A escolha pela administração de tratamento depende dos factores de risco de cada paciente. Cerca de um terço dos doentes não chega a necessitar de tratamento e tem uma longa sobrevivência, outro terço dos pacientes caracteriza-se por uma fase inicial indolente seguida de progressão da doença, os restantes doentes apresentam LLC-B agressiva requerendo tratamento imediato. Por norma, a pacientes mais jovens, em estados mais avançados da doença ou com factores de prognóstico adversos são normalmente administradas combinações de terapias mais agressivas e considera-se a hipótese de transplante alogénico no início do decurso da doença, uma vez que este é o único método potencial de “cura”. Pelo contrário, em relação aos pacientes mais velhos e sem factores de prognóstico adversos há pouca probabilidade de estes requererem tratamento, a não ser para minimizar os sintomas da doença. [44; 56]

#### **3.4.14.1. Quimioterapia**

Desde a década de 1950 que a terapia de primeira abordagem para a LLC-B consistia principalmente na administração de agentes alquilantes, como clorambucilo. Esta droga demonstrou a sua actividade na LLC-B ao reduzir o número de linfócitos, melhorar a função da medula óssea, e diminuir o alargamento dos nódulos linfáticos, fígado e baço. Tem-se sugerido que os pacientes que recebem esta terapia têm um risco aumentado, em relação aos pacientes não sujeitos a terapia, de desenvolver efeitos tóxicos a longo prazo como cancro secundários. [43; 56]

Outros agentes normalmente empregues são a ciclofosfamida, vincristina e prednisona. A terapia múltipla não é indicada, assim como o aumento da dose de clorambucilo (embora a resposta do paciente seja melhorada com este aumento) uma vez que existe um risco agravado de toxicidade sem benefícios notórios comprovados. [44; 60]

#### **Análogos de purina**

Análogos de purina, como a fludarabina, pentostatina e cladribina são agentes empregues regularmente no tratamento da LLC-B desde o seu aparecimento no final da década de 1980. Segundo um estudo dirigido por Rai, K. R. *et al* (2000), a fludarabina foi considerada superior ao clorambucilo por provocar uma resposta mais rápida, um intervalo de tempo mais longo de remissão da doença e melhoria da qualidade de vida do paciente, independentemente da idade. Também se comprovou que, isoladamente, a fludarabina mostrou actividade numa gama de doenças linfóides indolentes que não responderam a outros tratamentos, provocando a remissão completa de recaídas. [44; 56; 60]

Regimes combinatórios, nomeadamente fludarabina e clorambucilo têm resultado no aumento da resposta dos doentes à terapia. Se a estes dois fármacos for adicionado o rituximab, as respostas são ainda mais positivas. Outro análogo de purina que provou ser eficaz, singularmente ou em combinação com outros, no tratamento da LLC-B é a pentostatina. Cladribina tem sido estudada em várias experiências e parece produzir respostas similares às obtidas com clorambucilo. A sua associação com ciclofosfamida não melhorou a resposta dos pacientes. [56; 60]

A toxicidade provocada pelos análogos nucleosídicos é uma das limitações deste tipo de tratamento e pode ser relativamente frequente e, ocasionalmente severa, levando até à predisposição a uma variedade de infecções. Contudo, não se verificou um aumento na taxa de desenvolvimento de cancros secundários, quando se compararam doentes tratados com não tratados. [56; 60]

#### **3.4.14.2. Radioterapia**

O tratamento da LLC-B por radiação teve início há algumas décadas atrás. Os métodos de irradiação variam, abrangendo a totalidade do corpo ou áreas localizadas. A radiação do baço tem sido usada nos casos em que se verifica o seu inchaço, de modo a evitar a esplenectomia<sup>8</sup>, e pode induzir uma diminuição de curta duração da linfocitose do sangue periférico e do envolvimento dos nódulos linfáticos. Parece ser um tratamento efectivo em alguns doentes, mas frequentemente causa mielossupressão como sequela. [7; 44]

#### **3.4.14.3. Imunoterapia**

##### **Rituximab**

É um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao marcador CD20 e é activo contra a maioria das doenças linfóides da linhagem B, incluindo a LLC-B. Usado isoladamente é menos eficaz que quando empregue em associação com fludarabina apenas, com fludarabina e ciclofosfamida, ou com pentostatina e ciclofosfamida. Como o marcador de superfície CD20 é expresso em pequena quantidade na LLC-B, normalmente aumenta-se a dose desta droga para melhorar a sua actuação. Os efeitos secundários mais comuns incluem infecções e citopenias. [43; 56; 60]

Ainda não existem estudos suficientes que permitam adoptar o rituximab como terapia de primeira abordagem no tratamento da LLC-B. Há evidências de que a combinação de

---

<sup>8</sup> **Esplenectomia** – Remoção cirúrgica do baço, ou parte dele. Normalmente só se aplica em casos de alargamento do baço dolorosos, doentes resistentes a corticosteróides ou com anemia hemolítica autoimune ou trombocitopenia. [7; 44]



fludarabina, rituximab e alemtuzumab pode atingir um número significativo de remissões completas. [44; 60]

#### **Alemtuzumab**

É um anticorpo monoclonal humanizado contra o antígeno CD52, expresso em várias células, incluindo os linfócitos B, cuja principal função consiste na indução da apoptose das células malignas. Também foi estudado em combinação com rituximab apenas ou com fludarabina, ciclofosfamida e rituximab. [43; 56]

Se administrado subcutaneamente, os efeitos secundários são sobretudo locais, como eritema localizado, e raramente, febre e arrepios. [44]

Como o CD52 é expresso por linfócitos B e T e monócitos, a maior limitação sobre o seu uso consiste na imunossupressão significativa, provocando efeitos secundários a longo prazo, como infeções. [43; 44; 56]

#### **Outras imunoterapias**

Outras imunoterapias que se encontram em estudo incluem anticorpos dirigidos aos marcadores CD22, CD23 e CD25. Este último, embora seja expresso principalmente por linfócitos T normais e malignos, tem provado ser eficaz na LLC-B. [56]

### **3.4.14.4. Transplante de células hematopoiéticas**

#### **Alogénico**

Considera-se o único tratamento eficaz na LLC-B, mas limitado pela idade do paciente e disponibilidade de doadores. É um tratamento realizável em 50-70% dos pacientes e está associado a uma percentagem de mortalidade de 1% a 5%. Este procedimento pode proporcionar uma resposta de longa duração, com remissão da doença por longos períodos de tempo. Estes factores fazem desta terapia uma abordagem recorrente nos pacientes jovens em estados avançados da doença, uma vez que a terapia de primeira abordagem não é capaz de provocar respostas tão positivas como o transplante. No entanto, foram relatados síndromes mielodisplásicas/ leucemias mielóides agudas em 6-8% dos casos pós-cirúrgicos. [44; 56; 60]



### **Autólogo**

Estudos que envolveram transplante autólogo e quimioterapia em dose elevada para a LLC-B não demonstraram benefícios na sobrevivência do paciente, visto que as remissões são de curta duração. No entanto, quando comparado com os pacientes tratados apenas por quimioterapia mostrou um aumento de cerca de 5 anos de sobrevivência. Os resultados do autotransplante são melhores quando é efectuado nas fases iniciais da doença. Além disso, acredita-se que o transplante autólogo, quando comparado com o alogénico em termos de toxicidade do tratamento e sobrevivência, é mais benéfico. [44; 60]

**Objectivos**

- Aplicação de protocolos de cultura celular para a Leucemia Linfocítica Crónica do tipo B;
- Realização da técnica de bandeamento GTL;
- Observação e identificação dos cromossomas ao microscópio;
- Montagem de kariogramas no sistema de análise de imagem computadorizado;
- Aplicação da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), para pesquisa de três das alterações genéticas associadas à LLC-B (trissomia do cromossoma 12 e deleções dos *loci* 13q14 e 17p13);
- Identificação de alterações cromossómicas documentadas na literatura e determinação da existência de novas alterações recorrentes;
- Análise e comparação dos resultados obtidos por citogenética e por FISH na totalidade das amostras.

**Material**

## ▪ Citogenética Convencional

- Cinquenta amostras “cegas” de sangue periférico com LLC-B;
- Meio de cultura comercial (*Karyomax*);
- Cultura celular das amostras com protocolos utilizando diferentes estimuladores mitogénicos (TPA, *pokeweed*, PHA-M e lipopolissacarídeos);
- Aplicação do bandeamento GTL a todas as amostras.

## ▪ Citogenética Molecular

- Hibridização *in situ* por fluorescência das cinquenta amostras com as sondas:
  - ✓ Centromérica para o cromossoma 12 (*Vysis*);
  - ✓ Para a região do gene do Retinoblastoma 1 (RB1) (13q14) (*Vysis*);
  - ✓ Para a região do gene P53 (17p13) (*Vysis*).

## **Métodos**

### ⇒ **Citogenética Convencional**

As amostras utilizadas neste trabalho foram de sangue periférico, armazenado em tubos de heparina-lítio. Após a sua chegada ao laboratório, recolheu-se cerca de 1 ml de amostra para um tubo de EDTA que foi congelada para extracção de DNA ou estudos posteriores. Procedeu-se à cultura celular o mais brevemente possível.

Durante a cultura dos linfócitos é necessário ter em atenção determinados cuidados, por se tratar de uma amostra biológica humana e, portanto, implicar riscos para o operador.

Para a análise citogenética, cada amostra passa por diferentes etapas: cultura celular (1.), manipulação (2.), espalhamento (3.), bandeamento (4.), observação ao microscópio e análise de metafases com montagem do kariograma (5.).

### **1. Cultura celular**

Consiste na inoculação (sementeira) da amostra num tubo com meio de cultura (constituído por uma mistura de nutrientes e factores de crescimento a consumir pelas células e antibióticos), sob rigorosas condições de assépsia para evitar a contaminação das amostras por bactérias.

Uma vez que no sangue dos adultos os linfócitos circulantes não estão em divisão, é necessário adicionar ao meio de cultura agentes mitogénicos<sup>9</sup>. Os mitogénicos empregues (dirigidos aos linfócitos B, preferencialmente) e respectivos protocolos foram testados num trabalho anterior [76] que consistiu na optimização de protocolos de cultura celular dirigidos à LLC-B.

---

<sup>9</sup> **Agentes mitogénicos** - São substâncias químicas, normalmente proteínas, que induzem a divisão celular através da activação de proteínas cinases envolvidas em vias de transdução de sinais [62; 86]

- Foram inoculadas 5 gotas de sangue em tubos com cerca de 5 ml de meio de cultura enriquecido com estimuladores. Os protocolos utilizados são designados por letras, e empregam os seguintes mitogéneos e respectivas concentrações finais:

- **Protocolo A** - 1,2-O-tetradecanoilforbol-1,3-acetato (TPA)<sup>10</sup> [50 ng/ml] (descrito em **Anexo I**);
- **Protocolo C** - *Pokeweed* (*Phytolacca americana*)<sup>11</sup> [20 ng/ml] (descrito em **Anexo II**);
- **Protocolo D** - Fitohemaglutinina (PHA-M)<sup>12</sup> [20 ng/ml] (descrito em **Anexo III**);
- **Protocolo L** - Lipopolissacarídeos (LPS)<sup>13</sup> [40 mg/ml] (descrito em **Anexo IV**).

Também se efectuou um outro protocolo (B), sem adição de qualquer mitogéneo, designado “tubo branco” (descrito em **Anexo V**).

De maneira a submeter as células a vários ciclos celulares e, assim, obter um número significativo de células em divisão, todas as amostras foram incubadas a 37 °C, durante 71 horas (protocolos A e B), 72 horas (protocolos C e D) ou 5 dias (protocolo L). Os tubos dos protocolos C e D são colocados numa estufa de CO<sub>2</sub> a 5%.

## 2. Manipulação

À medida que o ciclo celular progride, os cromossomas vão sofrendo condensação, tornando-se mais pequenos e de baixa resolução. Sendo assim, a apreensão da divisão celular deve ser efectuada, não durante a metafase, mas sim durante o estágio menos

---

<sup>10</sup> **TPA** – Éster com uma vasta gama de efeitos celulares: promoção tumoral, modulação da diferenciação, alteração da morfologia celular e estimulação mitogénica. [64, 65, 66]

<sup>11</sup> **Pokeweed** – Lectina com capacidade de induzir a diferenciação de células B humanas em plasmócitos *in vitro*. [67; 68; 87]

<sup>12</sup> **PHA-M** – Mucoproteína extraída do feijão vermelho comum (*Phaseolus vulgaris*) que parece promover a transformação dos linfócitos em células T linfoblásticas (com capacidade de sintetizar DNA) tornando-as activas mitoticamente. [12; 35; 69; 70]

<sup>13</sup> **LPS** - São componentes característicos da parede celular das bactérias Gram negativas. Estimulam muitas das células B para proliferação e subsequente maturação em células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas. [71; 72; 73; 88]

condensado – profase tardia ou pro-metáfase, de modo a obter cromossomas que sejam o mais comprido possível para facilitar a identificação e análise. [62]

### 2.1. Colcemide

O inibidor mitótico mais utilizado e responsável por este efeito é o colcemide, um análogo sintético da colquicina, que impede a constituição do fuso acromático, interferindo com a formação dos microtúbulos. O tempo de exposição ao colcemide deve ser rigorosamente controlado porque, quando em excesso, este reagente provoca a condensação dos cromossomas, sendo esta directamente proporcional ao tempo de exposição e à sua concentração, e quando em concentração demasiado baixa não possibilita a obtenção de metafases. [27; 62]

- As amostras deste trabalho foram sujeitas a exposição ao colcemide durante uma hora, na concentração final de 10 µg/ml.

### 2.2. Solução salina

Posteriormente, os linfócitos são tratados com uma solução salina, normalmente de cloreto de potássio (KCl) a 0,075M, por provocar menos danos na subestrutura dos cromossomas e proporcionar um bandejamento adequado. Como esta solução tem concentração inferior à do citoplasma das células, vai causar o movimento da água, por osmose, da solução hipotónica para o interior celular, através da membrana plasmática, aumentando o volume das células de modo a alargar o espaço interior à membrana para os cromossomas se poderem espalhar. [27; 62; 74]

O volume de solução e o tempo de tratamento são parâmetros muito importantes, tendo em conta que, quando em demasia, podem fragilizar as células e levar à ruptura da membrana, com consequente perda de cromossomas e obtenção de metafases incompletas. [62; 63]

- A solução salina de KCl a 0,075M empregue foi previamente aquecida a 37 °C, a fim de evitar um choque térmico ao contactar com as células. Adicionaram-se cerca de 10 ml a cada tubo e todos eles foram incubados durante 15 minutos num banho a 37 °C.

### 2.3. Fixador

Por fim, é adicionado fixador, uma mistura de três partes de metanol para uma parte de ácido acético glacial (fixador de *Carnoy*). Tem como principal função remover a água das células e matá-las instantaneamente. Além disso, fortifica as membranas e cromatina, preservando as células e preparando os cromossomas para a fase seguinte – bandeamento – uma vez que extrai proteínas, entre as quais histonas, facilitando o contacto do corante com o material genético. Após adição do fixador, as células podem ser armazenadas no frigorífico por longos períodos de tempo. [62; 63; 74]

- O fixador foi preparado de fresco para cada manipulação, tendo em conta que os dois reagentes que o constituem, quando em contacto, formam acetatos. Foram efectuadas tantas lavagens quantas as necessárias (3 a 5) até que o sobrenadante ficasse totalmente transparente. A primeira lavagem ocorreu lentamente, sob agitação adequada e cuidadosa, de modo a homogeneizar bem e evitar a ruptura da membrana celular e perda de cromossomas. Após fixação as amostras foram mantidas no congelador.

### 3. Espalhamento

Consiste na deposição de gotas da suspensão celular, obtida após os tratamentos mencionados anteriormente, na superfície de uma lâmina de vidro limpa. A queda das gotas provoca tensão suficiente para a membrana celular romper e permitir o espalhamento dos cromossomas, visto que esta se encontra fragilizada pelos procedimentos prévios ao espalhamento. [27; 62; 63]

É um passo de extrema importância para um correcto bandeamento e a sua qualidade depende de uma vasta gama de factores, nomeadamente a temperatura e humidade do ambiente, o tipo de tecido, as condições de cultura e de manipulação, o tipo de lâmina e a sua lavagem, a qualidade do fixador, entre outras. [27; 63]

- Para facilitar a análise citogenética, prepararam-se lâminas com a melhor qualidade possível: densidade celular regular e uniforme, cromossomas suficientemente espalhados para evitar demasiadas sobreposições e com coloração cinzenta a cinzenta escura, e sem citoplasma. Posteriormente, as lâminas foram envelhecidas

sobre uma placa térmica a 60 °C durante cerca de uma hora e colocadas *overnight* à temperatura ambiente. Protocolo descrito no **Anexo VI**.

#### **4. Bandeamento**

Os primeiros registos de utilização do método de coloração das bandas G em cromossomas humanos remontam a 1971, por Sumner e seus colegas. As técnicas de bandeamento atribuem um padrão típico de bandas claras e escuras ao longo de todo o comprimento dos cromossomas, permitindo assim a sua identificação precisa e individual. Existem vários tipos de métodos, sendo o GTG o mais empregue actualmente devido à sua simplicidade, capacidade de formar bandas de elevada resolução e dispensar a utilização de microscópio de fluorescência. Requer um pré-tratamento com uma solução diluída de tripsina, lavagens em tampão e coloração com corante Giemsa. Investigadores como Wang e Federoff sugerem que a tripsina provoca hidrólise da componente proteica dos cromossomas, expondo o DNA ao corante. [27; 58; 62]

A natureza das bandas G ainda não está completamente esclarecida, contudo, actualmente a hipótese mais aceite defende que as regiões escuras, ditas positivas, são heterocromáticas, ricas em AT, com poucos genes activos e de replicação tardia; enquanto que as regiões claras, ou negativas, são ricas em GC, apresentam muitos genes activos e são replicadas precocemente. [58; 62]

- Neste trabalho foi empregue uma variante ao método de bandeamento GTG que emprega o corante Leishman, passando a designar-se a técnica por GTL. As lavagens foram efectuadas com solução salina NaCl 0,9%, tampão Gurr e água destilada. Protocolo descrito no **Anexo VII**.

#### **5. Observação e análise de metafases com montagem do cariógrama**

Foram analisadas ao microscópio óptico composto (*Zeiss Axioskop 40*) cerca de vinte metafases por cada amostra. As imagens foram captadas pelo sistema de imagens digital *Cytovision (UNIX Compatible)* e procedeu-se à montagem do cariógrama. As anomalias cromossómicas foram descritas segundo a nomenclatura ISCN 2005.



## ⇒ FISH

As amostras utilizadas para realização da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência são provenientes das suspensões celulares obtidas por citogenética convencional. Após espalhamento, as amostras foram conservadas em fixador de Carnoy, sob a temperatura de 4 °C, até serem utilizadas para FISH.

### 1. A técnica

Esta técnica baseia-se em duas etapas fundamentais:

- a) Desnaturação e reemparelhamento (hibridização) do DNA com a respectiva sonda marcada com fluorocromo;
  - b) Identificação (ou não) do sinal de fluorescência e interpretação do resultado.
- [23; 28]

A rapidez de resultados e a facilidade de execução, nomeadamente com a existência de *kits* comerciais com sondas e reagentes para a fluorescência, tornaram a FISH uma técnica recorrente de auxílio aos citogeneticistas. Envolve seis passos essenciais:

- Preparação das lâminas (1.1.);
- Preparação da sonda (1.2.);
- Desnaturação da sonda e cromossomas (1.3.);
- Hibridização da sonda com o *locus* em estudo (1.4.);
- Lavagem pós-hibridização (1.5.);
- Contraste dos cromossomas (1.6.);
- Análise microscópica (1.7.).

#### 1.1. Preparação das lâminas

Para a técnica FISH ser bem sucedida é importante investir na qualidade das lâminas, de modo a obter um espalhamento adequado e ausência de citoplasma e resíduos celulares que não interfiram com a hibridização. As lâminas devem ser usadas até 24 horas após serem preparadas, mas se forem conservadas a -20 °C em caixas com sílica gel para remover humidade podem ser usadas a longo prazo. Contudo, demasiada fixação pode conduzir a dificuldades de penetração da sonda e dos reagentes, enquanto que pouco tempo de fixação pode levar à perda de material. [22; 23; 63]

Posteriormente, as lâminas são envelhecidas de modo a remover impurezas, estabilizar o pH (eliminando vestígios do ácido acético do fixador) ou permitir que os cromossomas resistam à desnaturação em excesso. Vários procedimentos podem ser empregues para o envelhecimento, desde a simples colocação das lâminas numa placa de aquecimento, desidratação numa série de álcoois de concentração crescente ou incubação em soluções como SSC (citrato de sódio) ou PBS (tampão fosfato salino). [75]

- Neste trabalho em concreto, seleccionaram-se para cada ensaio células do protocolo que tivesse permitido uma melhor proliferação das células B de cada amostra, obedecendo, normalmente, à seguinte ordem decrescente de preferência: protocolo A, protocolo C e protocolo L. Em cada lâmina eram depositadas três gotas de suspensão celular para as respectivas sondas a utilizar, sendo assim, para cada amostra era preparada apenas uma lâmina. O envelhecimento era feito sobre uma placa térmica a 60 °C, durante uma hora aproximadamente, sendo depois retiradas e arrefecidas à temperatura ambiente. A hibridização das sondas com o DNA era efectuada no mesmo dia que o espalhamento das lâminas.

### 1.2. Preparação da sonda

Foram empregues três sondas para este estudo:

- Sonda  $\alpha$ -satélite do cromossoma 12 (protocolo descrito no **Anexo VIII**);
- Sonda para a região do Retinoblastoma 1 (RB1), localizado no cromossoma 13q14 - (protocolo descrito no **Anexo IX**);
- Sonda para o P53, localizado no cromossoma 17p13 (protocolo descrito no **Anexo X**).

As sondas foram conservadas a baixa temperatura (-20 °C) e descongeladas previamente à sua utilização.

### 1.3. Desnaturação da sonda e cromossomas

Uma vez que tanto a sonda como o material genético em estudo são constituídos por uma cadeia dupla de DNA é necessário desnaturá-los, separadamente ou em conjunto, de modo a viabilizar a hibridização entre ambos. A sonda e o DNA-alvo podem sofrer desnaturação pelo calor, no entanto, o último também pode ser sujeito a tratamento com solução de formamida e SSC a temperatura elevada (65 °C a 85 °C). Segue-se a aplicação da sonda no local seleccionado da lâmina (de preferência com grande concentração de metafases e núcleos) e é coberta com uma lamela. [27; 58]

- No caso concreto das amostras de LLC-B, após adição do volume desejado das três sondas (trissomia do cromossoma 12: 2µl, delecção da região 13q14: 2-2,5 µl, delecção do locus 17p13: 2-2,5 µl), colocaram-se lamelas sobre as respectivas gotas que foram rodeadas por cola, de maneira a não provocar a mistura das sondas na mesma lâmina. A desnaturação ocorreu sob temperaturas elevadas, por deposição das lâminas sobre uma placa térmica a 75 °C, durante 5 minutos.

### 1.4. Hibridização da sonda com o locus em estudo

Consiste no emparelhamento entre as cadeias simples da sonda e do DNA-alvo, com base na complementaridade entre ambas. [20; 58]

- As lâminas com as sondas e amostra em estudo foram incubadas durante pelo menos 17 horas numa câmara húmida e escura. A temperatura de hibridização rondou os 37 °C para assegurar um sinal com máxima intensidade e para evitar ligações não-específicas da sonda.

### 1.5. Lavagem pós-hibridização

Tem como função remover a sonda em excesso que não se ligou ao locus em estudo ou se ligou inespecificamente a outros cromossomas, citoplasma ou restos celulares. [23; 27; 58]

- As lavagens foram realizadas em SSC sob temperatura (73 °C e temperatura ambiente) e concentração (0,4x e 2x) adequadas de modo a não remover, também, a sonda ligada ao DNA-alvo.

### 1.6. **Contraste dos cromossomas**

De modo a proporcionar contraste com a cor utilizada para visualizar a hibridização da sonda com o *locus* alvo, o complemento total cromossómico é corado com cor diferente à fluorescência. O DAPI, contrastante azul, é o mais frequentemente utilizado, podendo também ser empregue o iodeto de propídeo (vermelho). [22; 23; 58]

- Para este trabalho foi utilizado um volume de 8µl de meio de montagem *VectaShield* com DAPI por lâmina.

### 1.7. **Análise microscópica**

Realizados os passos descritos anteriormente, as preparações cromossómicas podem ser, finalmente, observadas ao microscópio de epifluorescência (*Nikon Eclipse E400*) equipado com os filtros adequados e ao abrigo da luz. Foram observados cem a duzentos núcleos em cada reacção de hibridização e captadas imagens das amostras com anomalias, pelo sistema de imagens *Leica CW4000 FISH*.

**Registo de resultados****⇒ Citogenética Convencional**

Neste trabalho procedeu-se à cultura de linfócitos de amostras de sangue periférico com leucemia linfocítica crónica do tipo B, estimuladas pelos seguintes mitogéneos:

- **Cultura A** - estimulada pela adição de 50 µl de TPA,
- **Cultura B** - “tubo branco”, sem adição de qualquer estímulo mitogénico,
- **Cultura C** - estimulada pela adição de 100 µl de *pokeweed*,
- **Cultura D** - estimulada pela adição de 100 µl de PHA-M,
- **Cultura L** - estimulada pela adição de 1 ml de LPS.

Os protocolos utilizados foram testados e optimizados num trabalho anterior [76] e a sua selecção para esta tese baseou-se no facto de terem fornecido os melhores resultados, permitindo a obtenção de um grande número de metafases, com cromossomas de boa resolução e estrutura para facilitar a análise citogenética.

Foi possível realizar os cinco protocolos de cultura em dezoito amostras (amostras 33 a 50). No entanto, devido a quantidade insuficiente de sangue periférico colhido, não foi possível efectuar a cultura C em quatro amostras (29 a 32), a cultura L em três amostras (1, 2 e 10), e ambas as culturas (C e L) em 25 amostras (3 a 9, 11 a 28).

Efectuou-se o registo dos protocolos empregues para cada amostra em folhas de cultura (**Anexo XI**) elaboradas para este trabalho.

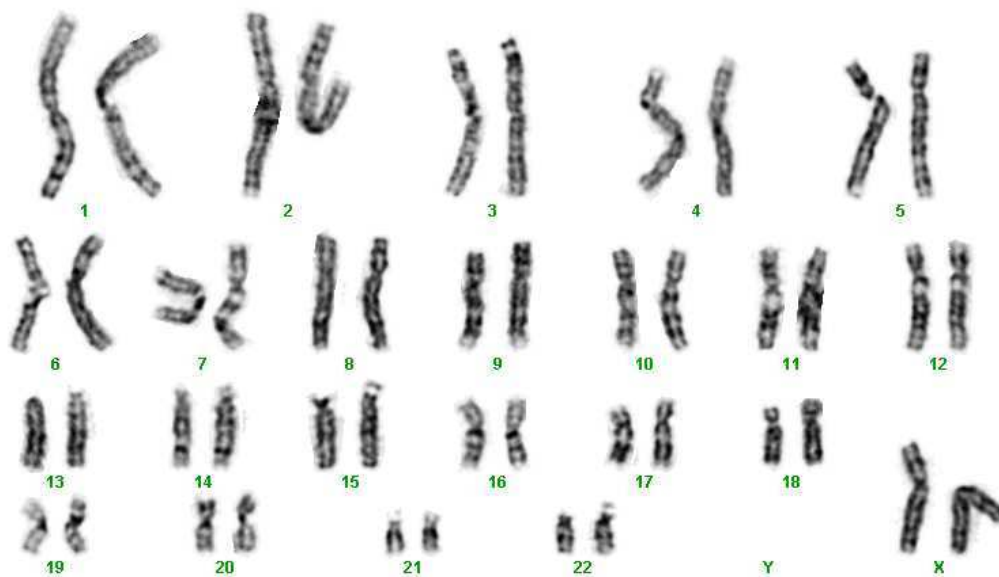
O método de bandeamento GTL permitiu que os cromossomas adquirissem um padrão de bandas com a resolução pretendida para a análise citogenética.

Em todas as amostras se obtiveram metafases com a qualidade desejável para análise. Sempre que possível foram analisadas, no mínimo, vinte metafases por cada amostra, no entanto, em dezassete amostras (1, 2, 3, 6, 10, 26, 31, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 46, 48 e 49) tal não se verificou (**Tabela 2**).

Da análise destas cinquenta amostras denotou-se que o estimulador PHA-M, na generalidade, foi o que forneceu maior número de metafases, com os cromossomas mais longos (**Figura 15**). No entanto, tendo em conta que essas metafases foram obtidas essencialmente pela estimulação de linfócitos T, foram empregues apenas para despistar



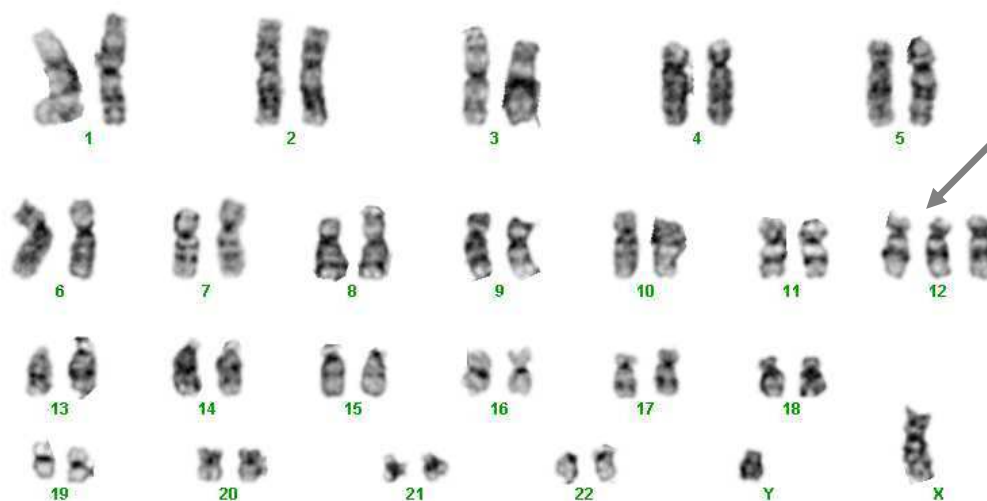
ou confirmar a presença de alguma anomalia genética constitucional. Como essa situação não se verificou em nenhuma das amostras englobadas neste estudo, essas metafases não foram contabilizadas para a contagem de metafases totais analisadas.



**Figura 15** - Cariograma da amostra 15 obtido por cultura com PHA-M (protocolo D)

Em relação aos mitogéneos TPA e *pokeweed*, a qualidade das preparações obtidas por ambas foi semelhante (boa resolução de bandas e cromossomas de dimensão desejável para análise) (**Figura 17** e **Figura 19**, respectivamente), no entanto o primeiro permitiu obter maior número de metafases.

Com a cultura estimulada por lipopolissacarídeos as metafases eram de resolução razoável, mas escassas (**Figura 16**). Nas amostras que apresentavam cariótipo anormal e em que foi empregue o protocolo de cultura com estimulação por LPS, denotou-se que, apesar do número reduzido, a totalidade das metafases obtidas com esse mitogéneo apresentava anomalias (devido à sua especificidade para os linfócitos B), como se constatou nas amostras 29, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49.



**Figura 16** - Cariograma da amostra 29, com trissomia do cromossoma 12, obtido por cultura com LPS (protocolo L)

No tubo branco, que funcionou como tubo controlo, obteve-se crescimento celular em onze das amostras (amostras 4, 13, 16, 18, 23, 26, 29, 43, 45, 48 e 50), sendo as metafases de qualidade insatisfatória, raramente analisáveis.

Da análise citogenética, verificou-se que:

- dezassete amostras (34%) apresentaram constituição genética normal (amostras 9, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 24, 26, 27, 33, 36, 40, 42, 43, 46 e 48);
- as restantes trinta e três amostras (66%) apresentaram anomalias cromossómicas (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – Registo dos resultados obtidos por citogenética convencional das cinquenta amostras de LLC-B englobadas neste estudo

Am.	Met. c/ Car. N.	+12	del (13q14)	del (17p13)	Outras anomalias	Met. T.
1	13	----	2	----	-----	15
2	15	----	----	----	add(7) [2]	17
3	15	----	3	----	-----	18
4	40	12	----	----	+12, +18 [12]	52
5	19	----	3	----	-----	22
6	15	----	2	----	add(21)? [2]	19
7	13	2	----	8	Rearranjos complexos envolvendo os cromossomas (3; 4; 7; 12; 14) [6]	27
8	31	----	----	----	45, X [5]	36
9	28	----	----	----	-----	28
10	----	2	----	3	t(7;14) (q22;q22), t(13;17) (p10;q10), +12 [2]; t(7;14) (q22;q22), del(17) (p13.1) [3]; t(7;14) (q22;q22) [12]	17
11	32	9	----	----	t(2;6;18), +12 [7]; 45, X [5]; t(15;21) [1]	46
12	20	5	3	----	-----	28
13	25	----	----	----	-----	25
14	24	----	2	----	-----	26
15	25	----	----	----	-----	25
16	30	----	----	----	-----	30
17	22	1	----	----	-----	23
18	30	----	----	----	-----	30
19	40	----	----	----	-----	40
20	33	----	----	----	-----	33
21	13	5	2	----	-----	20
22	17	----	4	----	-----	21
23	18	13	----	----	-----	31
24	30	----	----	----	-----	30



**Registo dos resultados**

25	23	----	----	----	45, X [10]	33
26	15	----	----	----	-----	15
27	21	----	----	----	-----	21
28	15	----	----	----	del(11) (q13) [7]	22
29	21	22	----	----	-----	43
30	17	----	12	----	inv(11) (p15;q13) [2]	31
31	5	11	----	----	-----	16
32	7	----	7	----	t(1;4) (p?;q?), t(14;15) (q?;q?), del(13)(q) [7] t(1;4) (p?;q?), t(14;15) (q?;q?) [9]	23
33	20	----	----	----	-----	20
34	9	11	----	----	-----	20
35	15	----	----	----	der(2) ? [2]	17
36	20	----	----	----	-----	20
37	7	----	5	----	-----	12
38	6	----	1	1	-----	8
39	17	----	3	3	der(X), del(13) (q14) [3]	23
40	25	----	----	----	-----	25
41	13	----	2	3	-----	18
42	17	----	----	----	-----	17
43	15	----	----	----	-----	15
44	11	----	4	----	-----	15
45	28	----	4	----	-----	32
46	12	----	----	----	-----	12
47	22	----	2	----	-----	24
48	15	----	----	----	-----	15
49	13	----	3	----	-----	16
50	21	----	----	----	+21 [2]	23

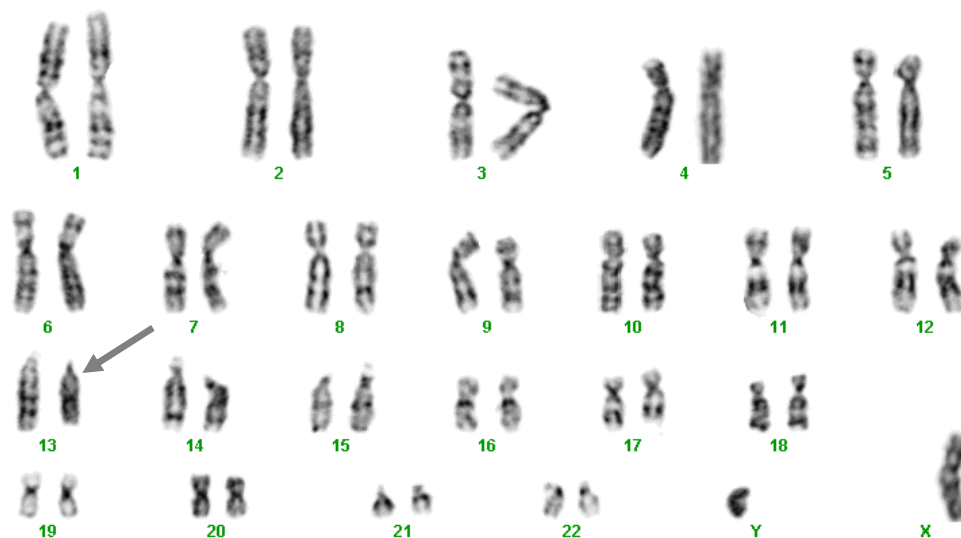
**Legenda da tabela:** Am. – Número da amostra; Met. c/ Car. N. – Metafases analisadas com cariótipo normal; +12 – Metafases com trissomia do cromossoma 12; del (13q14) - Metafases com deleção do locus 13q14; del (17p13) - Metafases com deleção do locus 17p13; Met. T. - Metafases totais analisadas



De entre as trinta e três amostras com alterações genéticas detectadas por métodos convencionais, verificaram-se as seguintes frequências:

⇒ **Delecção do cromossoma 13q14**

18 amostras (1, 3, 5, 6, 12, 14, 21, 22, 30, 32, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49)

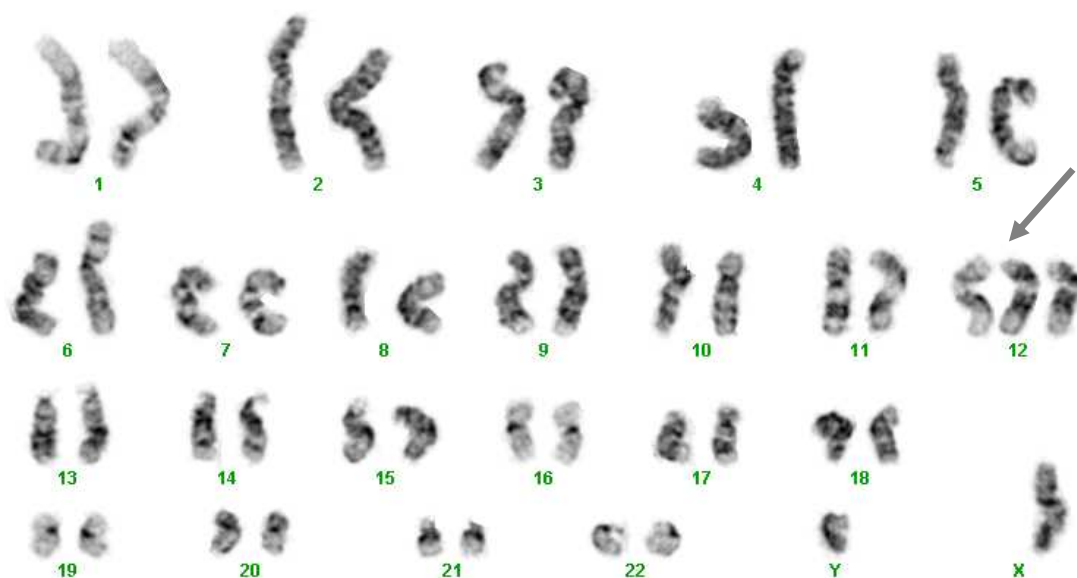


**Figura 17** - Cariograma da amostra 5 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia a delecção da banda q14 do cromossoma 13



⇒ **Trissomia do cromossoma 12**

11 amostras (4, 7, 10, 11, 12, 17, 21, 23, 29, 31, 34)

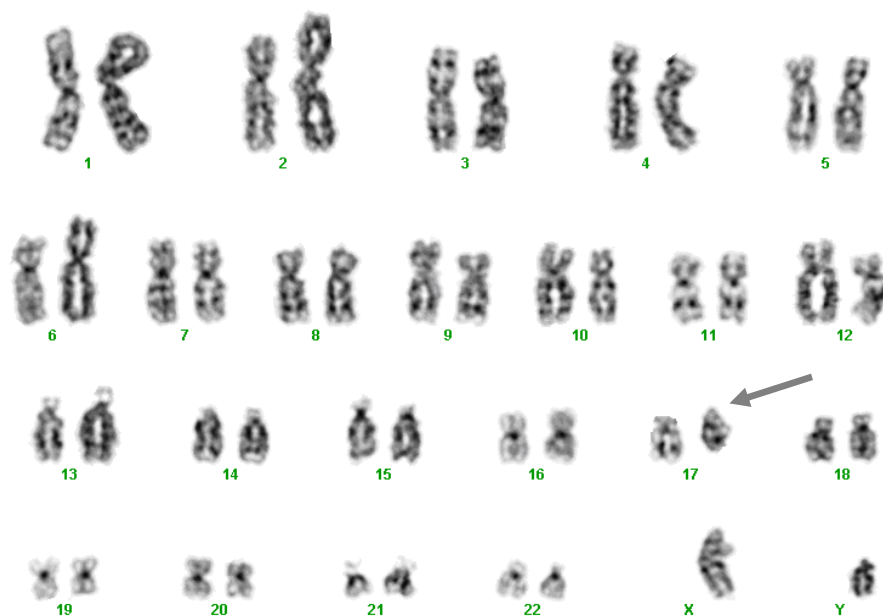


**Figura 18** - Cariograma da amostra 23 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia trissomia do cromossoma 12



⇒ Delecção do cromossoma 17p13

5 amostras (7, 10, 38, 39, 41)



**Figura 19** - Cariograma da amostra 41 obtido por cultura com *pokeweed* (protocolo C). A seta evidencia a delecção da região para o gene P53 do cromossoma 17

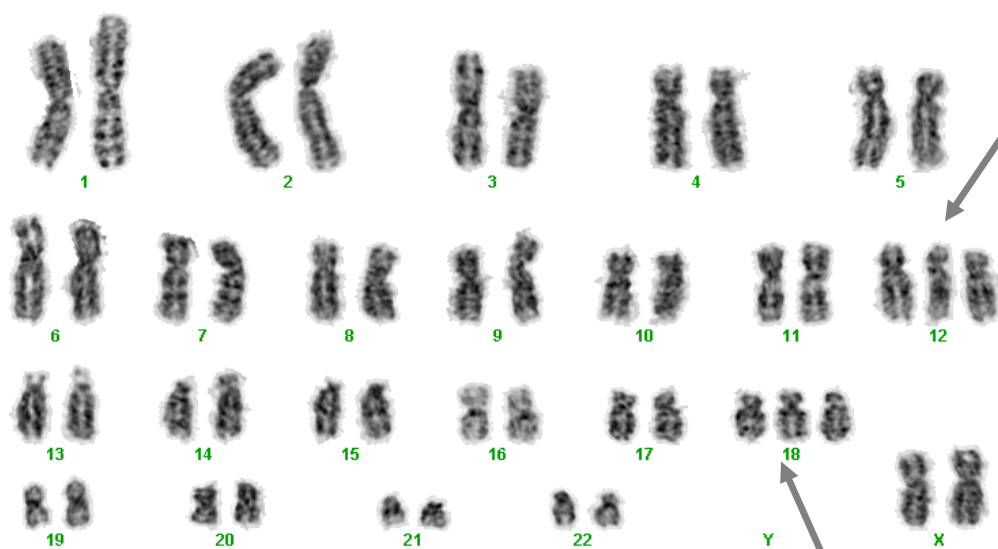
⇒ **Outras anomalias cromossómicas**

- **Material adicional:**

- ✓ amostra 2 – add(7)
- ✓ amostra 6 – add(21)?

- **Outras trissomias:**

- ✓ amostra 4 – trissomia do cromossoma 18 (em simultâneo com trissomia do cromossoma 12) (**Figura 20**)
- ✓ amostra 50 – trissomia do cromossoma 21

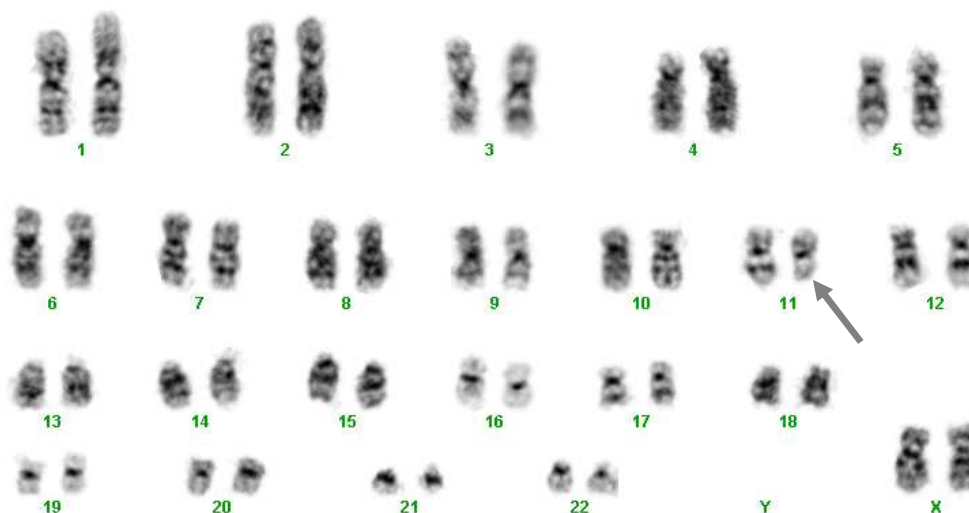


**Figura 20** - Cariograma da amostra 4 obtido por cultura com TPA (protocolo A). As setas evidenciam trissomias dos cromossomas 12 e 18



**- Outras deleções:**

- ✓ amostra 28 – del(11) (q13) (**Figura 21**)



**Figura 21** - Cariograma da amostra 28 obtido por cultura com TPA (protocolo A). A seta evidencia a deleção da região q13 a qter do cromossoma 11

**- Inversões:**

- ✓ amostra (30) – inv(11) (p15;q13)

**- Perda de um cromossoma sexual:**

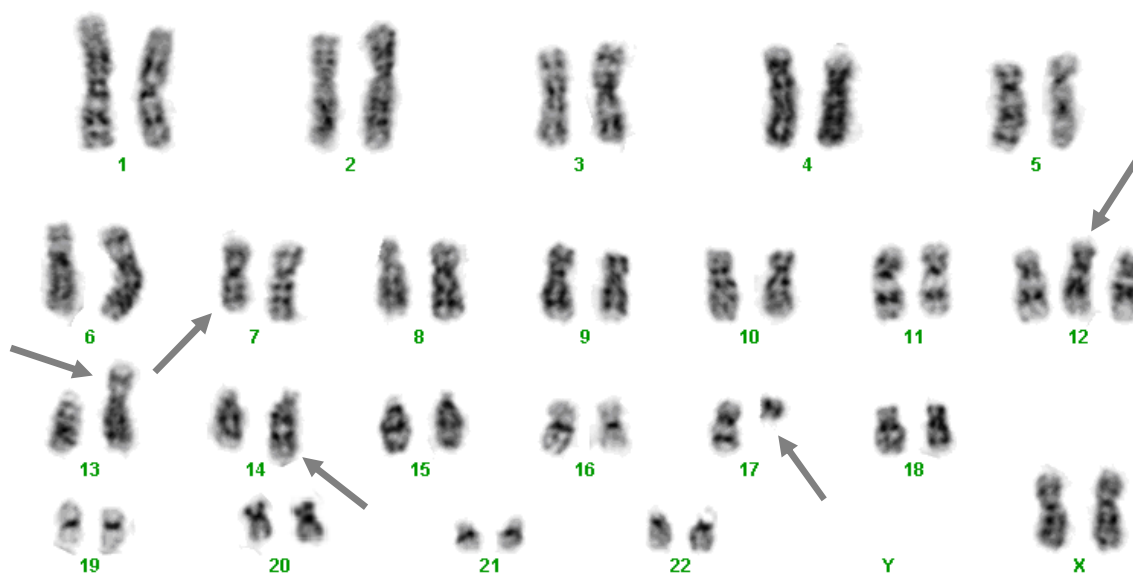
- ✓ amostras 8 e 25 – perda de um cromossoma X
- ✓ amostra 11- perda do cromossoma Y

**- Derivativos de cromossomas:**

- ✓ amostra 35 – der(2)?
- ✓ amostra 39 – der(X)

- Rearranjos complexos envolvendo vários cromossomas:

- ✓ amostra 7 – rearranjos entre os cromossomas (3; 4; 7; 12; 14)
- ✓ amostra 10 – t(7;14) (q22;q22), t(13;17) (p10;q10) (**Figura 22**)
- ✓ amostra 11 – t(2;6;18); t(15;21)
- ✓ amostra 32 – t(1;4) (p?;q?), t(14;15) (q?;q?)



**Figura 22** - Cariograma da amostra 10 obtido por cultura com TPA (protocolo A). As setas evidenciam translocações entre os cromossomas 7 e 14 (bandas q22 e q22, respectivamente) e entre os cromossomas 13 e 17 (bandas p10 e q10, respectivamente) e ainda a presença de um cromossoma 12 extra

Da análise citogenética das cinquenta amostras foi possível estabelecer os respectivos cariótipos (**Tabela 3**). As amostras 4, 6, 7, 10, 11, 12, 21, 30, 32, 38, 39, 41 apresentaram mais que uma alteração cromossômica em simultâneo.

De salientar ainda que neste estudo se verificou uma razão de 28 homens para 22 mulheres (1:1, aproximadamente) e a idade média das amostras foi de 72 anos.

**Tabela 3 – Cariótipo estabelecido para cada uma das amostras em estudo**

Amostra nº	Cariótipo
1	46, XX, del(13) (q14) [2] / 46, XX [13]
2	46, XY, add(7) [2] / 46, XY [15]
3	46, XY, del(13) (q14) [3] / 46, XY [15]
4	48, XX, +12, +18 [12] / 46, XX [40]
5	46, XY, del(13) (q14) [3] / 46, XY [19]
6	46, XY, del(13) (q14) [2]/ 46, XY, add(21)? [2] / 46, XY [15]
7	47, XY, +12, del(17) (p13) [2] / 46, XY, del(17) (p13) [6] /46, XY, ? [6] /46, XY [13]
8	45, X [5] / 46, XX [31]
9	46, XX [28]
10	46, XX, t(7;14) (q22; q22), t(13; 17) (p10; q10), +12 [2] / /46, XX, t(7;14) (q22; q22), del(17) (p13.1) [3]/ 46, XX, t(7;14) (q22; q22) [12]
11	45, X [5] /47, XY, t(2; 6; 18), +12 [7]/ 47, XY,+12 [2]/ 46,XY [32]
12	46, XX, del(13) (q14) [3] / 47, XX, +12 [5] / 46, XX [20]
13	46, XX [25]
14	46, XX, del(13) (q14) [2] / 46, XX [24]
15	46, XX [25]
16	46, XX [30]
17	47, XY, +12 [1] / 46, XY [22]
18	46, XY [30]
19	46, XY [40]
20	46, XY [33]
21	46, XY, del(13) (q14) [2] / 47, XY, +12 [5] / 46, XY [13]
22	46, XX, del(13) (q14) [4] / 46, XX [17]
23	47, XY, +12 [13] / 46, XY [18]
24	46, XY [30]
25	45, X [10] / 46, XX [23]
26	46, XX [15]
27	46, XX [21]
28	46, XX, del(11) (q13) [7] / 46, XX [15]
29	47, XY, +12 [22] / 46, XY [21]



30	46, XX, inv(11) (p15;q13) [2]/ 46, XX, del(13) (q14) [12]/ 46, XX [17]
31	47, XX, +12 [11] / 46, XX [5]
32	46, XY, t(1;4) (p?;q?), t(14;15) (q?;q?), del(13) (q) [7] / 46, XY, t(1;4) (p?;q?), t(14;15) (q?;q?) [9]/ 46, XY [7]
33	46, XY [20]
34	47, XX, +12 [11] / 46, XX [9]
35	46, XY, der(2) ? [2] / 46, XY [15]
36	46, XY [20]
37	46, XY, del(13) (q14) [5] / 46, XY [7]
38	46, XY, del(13) (q14) [1] / 46, XY, del(17) (p13.1) [1] / 46, XY [6]
39	46, Y, der(X), del(13) (q14) [3] / 46, XY, del(17) (p13) [3] / 46, XY [17]
40	46, XX [25]
41	46, XY, del(13) (q14) [2]/ 46, XY, del(17) (p13.1) [3]/ 46, XY [13]
42	46, XX [17]
43	46, XY [15]
44	46, XY, del(13) (q14) [4] / 46, XY [11]
45	46, XY, del(13) (q14) [4] / 46, XY [28]
46	46, XX [12]
47	46, XY, del(13) (q14) [2]/ 46, XY [22]
48	46, XY [15]
49	46, XX, del(13) (q14) [3]/ 46, XX [13]
50	47, XY, +21 [2] / 46, XY [21]

**⇒ FISH**

Os protocolos aplicados neste trabalho foram adquiridos através do fornecedor que comercializa as sondas, pelo que estes já se encontram otimizados. Apenas uma alteração foi efectuada e consistiu na diminuição do volume de sonda empregue: o fornecedor sugeria a aplicação de 10µl de sonda (no caso da sonda para o cromossoma 12) ou 10µl de mistura, constituída por sonda, tampão e água (nos casos das sondas para as regiões codificadoras dos genes RB1 e P53), mas o emprego de apenas 2-2,5µl permitiu obter um sinal de fluorescência bem visível.

As lâminas foram preparadas no próprio dia, envelheceram durante 5 a 6 horas e a sonda foi adicionada ao final da tarde. Nos casos em que a hibridização não foi bem sucedida, ou ocorreram dúvidas na percentagem de sinais positivos para determinada anomalia, repetiu-se o procedimento.

Não foram considerados núcleos sobrepostos ou degradados para a contagem dos sinais observados e as amostras foram consideradas positivas para estas anomalias quando detectadas em pelo menos 10% dos núcleos (e/ou metafases) observados.

Das três sondas empregues para este estudo, a  $\alpha$ -satélite para o cromossoma 12 era, claramente, a que emitia o sinal fluorescente mais forte.

Da análise por FISH, detectou-se que:

- vinte e três amostras (2, 8, 9, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24, 25, 26, 28, 33, 35, 36, 40, 42, 43, 46, 48, 50) (46%) não apresentaram nenhuma das três alterações genéticas em estudo;
- as restantes vinte e sete amostras (1, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 14, 21, 22, 23, 27, 29, 30, 31, 32, 34, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49) (54%) apresentaram uma ou duas das anomalias cromossómicas pesquisadas por esta técnica (**Tabela 4**).

**Tabela 4** - Registo dos resultados obtidos por FISH das cinquenta amostras de LLC-B englobadas neste estudo

Amostra nº	Trissomia do 12	del(13q)	del(17p)
1	Negativa	Positiva	Negativa
2	Negativa	Negativa	Negativa
3	Negativa	Positiva	Negativa
4	Positiva	Negativa	Negativa
5	Negativa	Positiva	Negativa
6	Negativa	Positiva	Negativa
7	Positiva	Negativa	Positiva
8	Negativa	Negativa	Negativa
9	Negativa	Negativa	Negativa
10	Positiva	Negativa	Positiva
11	Positiva	Negativa	Negativa
12	Positiva	Positiva	Negativa
13	Negativa	Negativa	Negativa
14	Negativa	Positiva	Negativa
15	Negativa	Negativa	Negativa
16	Negativa	Negativa	Negativa
17	Negativa	Negativa	Negativa
18	Negativa	Negativa	Negativa
19	Negativa	Negativa	Negativa
20	Negativa	Negativa	Negativa
21	Positiva	Positiva	Negativa
22	Negativa	Positiva	Negativa
23	Positiva	Negativa	Negativa
24	Negativa	Negativa	Negativa
25	Negativa	Negativa	Negativa
26	Negativa	Negativa	Negativa
27	Negativa	Positiva	Negativa
28	Negativa	Negativa	Negativa
29	Positiva	Negativa	Negativa

30	Negativa	Positiva	Negativa
31	Positiva	Negativa	Negativa
32	Negativa	Positiva	Negativa
33	Negativa	Negativa	Negativa
34	Positiva	Negativa	Negativa
35	Negativa	Negativa	Negativa
36	Negativa	Negativa	Negativa
37	Negativa	Positiva	Negativa
38	Negativa	Positiva	Positiva
39	Negativa	Positiva	Positiva
40	Negativa	Negativa	Negativa
41	Negativa	Positiva	Positiva
42	Negativa	Negativa	Negativa
43	Negativa	Negativa	Negativa
44	Negativa	Positiva	Negativa
45	Negativa	Positiva	Negativa
46	Negativa	Negativa	Negativa
47	Negativa	Positiva	Negativa
48	Negativa	Negativa	Negativa
49	Negativa	Positiva	Negativa
50	Negativa	Negativa	Negativa

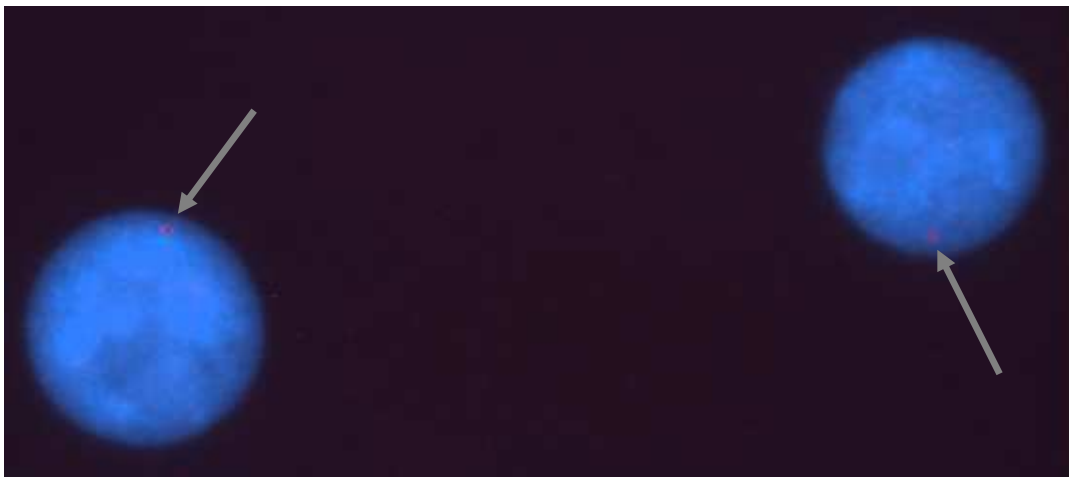
Como seria de esperar, a FISH permitiu confirmar a presença de anomalias cromossómicas detectadas por citogenética convencional, sendo que a deleção do cromossoma 13q14 foi a anomalia mais frequente, seguida da trissomia do cromossoma 12 e da deleção do cromossoma 17p13. Apesar de os valores não serem totalmente concordantes com os obtidos por métodos clássicos, identificaram-se as seguintes incidências:



⇒ **Delecção do cromossoma 13q14**

19 amostras (1, 3, 5, 6, 12, 14, 21, 22, 27, 30, 32, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 49)  
(Figura 23).

A FISH confirmou esta delecção em todas as amostras em que havia sido identificada por citogenética convencional. A amostra 27 mostrou ser positiva para esta alteração por FISH (com 11,90% dos núcleos/metáfases com um sinal para a região 13q14), contudo, por métodos convencionais foi imperceptível a sua detecção.

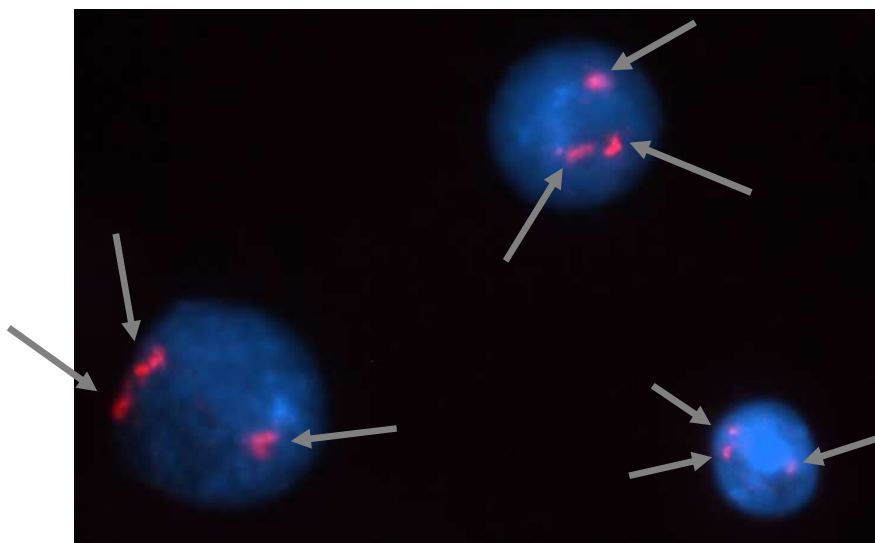


**Figura 23** – Visualização da hibridização da sonda para o gene RB1 (13q14) com dois núcleos celulares aos quais foi aplicada a técnica FISH. As setas evidenciam o único sinal detectado (amostra 45), identificando a delecção do *locus*

⇒ **Trissomia do cromossoma 12**

10 amostras (4, 7, 10, 11, 12, 21, 23, 29, 31, 34) (**Figura 24**).

Também a citogenética clássica havia detectado a trissomia do cromossoma 12 nestas amostras. Pela análise por métodos convencionais da amostra 17, detectou-se uma metafase (num total de vinte e três analisadas) com um cromossoma 12 extra. Com a técnica FISH observaram-se duzentos núcleos/metafases e destes, foi detectada uma percentagem de 5,70% com três sinais para o centrómero do cromossoma 12. Apesar de esta percentagem ser inferior à estipulada pelo laboratório (10%) para se considerar uma anomalia recorrente é um valor a considerar, tendo em conta que a citogenética permitiu a identificação da trissomia. Trata-se, portanto, de um caso com mosaico de baixa incidência.



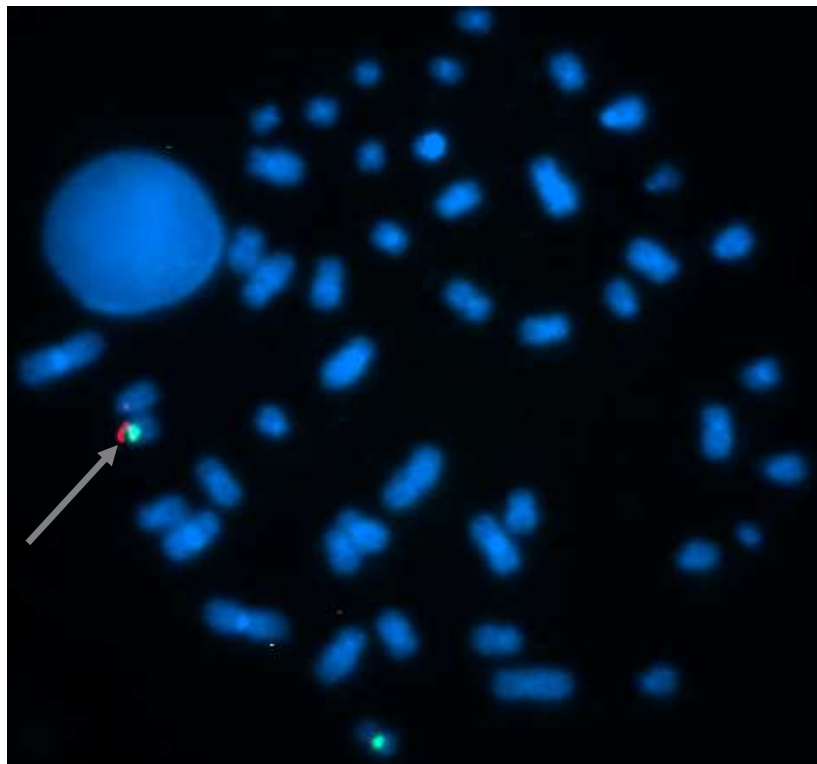
**Figura 24** - Observação em núcleos celulares dos sinais de fluorescência após hibridização *in situ* com sonda  $\alpha$ -satélite para o cromossoma 12. As setas evidenciam a presença de 3 sinais para o centrómero do cromossoma 12 nos três núcleos (amostra 34)



⇒ **Delecção do cromossoma 17p13**

5 amostras (7, 10, 38, 39, 41) (**Figura 25**).

A FISH permitiu confirmar esta delecção, também identificada por citogenética, nestas cinco amostras.



**Figura 25** - Metafase e núcleo celular aos quais foi aplicada a técnica FISH, com sonda para o cromossoma 17p13. A seta evidencia a presença de um só sinal (a vermelho) para a região codificadora do gene P53 (amostra 38), indicando positividade para a delecção deste *locus*

Denota-se ainda o facto de que sete das cinquenta amostras mostraram ser simultaneamente positivas para duas das alterações cromossómicas estudadas por FISH:

- amostra 7 e 10 – Trissomia do cromossoma 12 e deleção do *locus* 17p13;
- amostra 12 e 21 – Trissomia do cromossoma 12 e deleção do *locus* 13q14;
- amostra 38, 39 e 41 – Deleção dos *loci* 13q14 e 17p13.



**Discussão de resultados****⇒ Citogenética Convencional**

Para a realização deste trabalho foram efectuadas culturas de linfócitos das cinquenta amostras em estudo, sob os cuidados necessários no que diz respeito quer às condições de assépsia, para evitar possíveis contaminações, quer ao risco para o operador de manusear amostras biológicas humanas, tendo em conta todos os perigos que tal acarreta.

A actividade mitótica *in vitro* dos linfócitos B de amostras de neoplasias é reduzida, sendo a citogenética convencional uma técnica, habitualmente, árdua e com uma baixa taxa de sucesso. Contudo, esta dificuldade pode ser colmatada pela utilização de mitogéneos na cultura celular, que causam o mesmo efeito que antígenos estranhos ao organismo, desencadeando mecanismos de transformação dos linfócitos B em células mitoticamente activas. [51; 77] Baseando-se nestes conhecimentos e sob o efeito dos estimuladores mitogénicos adequados, foi possível obter metafases analisáveis na totalidade das cinquenta amostras de LLC-B desta tese (**Tabela 2**). Estes resultados positivos contrariam a tendência actual que leva os clínicos a preferirem outras abordagens à citogenética convencional no que toca ao estudo da LLC-B, por a última se tratar, segundo eles, de uma técnica pouco produtiva, até mesmo na presença de mitogéneos. [9]

Os mitogéneos empregues neste trabalho apresentam especificidades diferentes:

- os lipopolissacarídeos, de todos os estimuladores utilizados, são os únicos dirigidos especificamente aos linfócitos B;
- seguem-se o TPA e *pokeweed* que estimulam tanto linfócitos B como T;
- e por fim a PHA-M, mais efectiva na estimulação das células T, no entanto, também pode contribuir para a activação dos linfócitos B como consequência da transformação das primeiras. [77] Apesar da PHA-M poder estimular indirectamente o ciclo celular das células B, a sua utilização neste estudo teve como principal objectivo identificar e distinguir eventuais anomalias cromossómicas constitucionais de anomalias adquiridas em função da patogénese da LLC-B.

## Discussão dos resultados

A análise citogenética consistiu na observação de metafases ao microscópio e montagem do kariograma. Para tal, após manipulação das amostras, foi necessário preparar as lâminas a serem observadas que foram envelhecidas à temperatura ambiente *overnight*. Recorreu-se ao bandejamento para visualizar os cromossomas, sendo a técnica GTL a utilizada rotineiramente, cujo princípio básico consiste na acção da enzima tripsina para digestão proteica e posterior coloração do material genético pelo corante Leishman.

Em 34% das amostras foi analisado um número de metafases inferior ao recomendado (20), visto que não foi possível obter-se cromossomas com os padrões de qualidade e resolução desejáveis (**Tabela 2**). Em algumas delas foi necessário repetir o espalhamento, sem comprometer a análise por FISH.

Em relação à eficiência dos estimuladores empregues, denotou-se durante a análise dos cromossomas que:

- a PHA-M permitiu obter cromossomas mais alongados e com maior número de bandas, contudo, por estimular essencialmente linfócitos T (embora os B possam sofrer a sua acção indirecta) foi utilizado apenas para excluir qualquer alteração congénita, e não adquirida;
- o TPA possibilitou a obtenção de resultados muito satisfatórios, resultando em metafases em abundância, com cromossomas alongados e com boa resolução de bandas;
- o *pokeweed*, à semelhança do TPA, permitiu bons resultados no que toca à qualidade das metafases. No entanto, em relação à quantidade das mesmas, a sua eficiência é inferior à do TPA;
- com os lipopolissacarídeos foi possível obter metafases analisáveis, embora escassas, e com cromossomas de boa resolução, contudo mais pequenos que os obtidos com os mitogéneos anteriores;

O protocolo B, sem estimulador adicionado, permitiu constatar a eficácia dos mitogéneos empregues, funcionando como um tubo controlo. Seria de esperar não obter metafases com esta cultura, o que não se verificou em alguns casos. Este acontecimento pode estar relacionado com o estágio de desenvolvimento da própria doença daquelas amostras em concreto ou com outras implicações, como por exemplo, a ocorrência simultânea de LLC-B e outras síndromes linfoproliferativas.

Em relação ao estudo citogenético e de acordo com os resultados descritos na **Tabela 2**, verificou-se que:

- das cinquenta amostras de LLC-B estudadas, 34% apresentaram cariótipo normal, enquanto que nas restantes amostras (66%) foram identificadas alterações cromossómicas. Estes valores reforçam desde já a importância deste projecto que comprovou que a adopção de protocolos de cultura celular otimizados permite aumentar o valor percentual de anomalias cromossómicas detectadas por citogenética em comparação com outros trabalhos [51; 53], nos quais só foi possível identificar anomalias em 40-50% dos casos;
- entre as amostras com anomalias, foram identificadas quatro das alterações genéticas mais recorrentes da LLC-B:
  - deleção do *locus* 13q14: detectada em dezoito dos casos estudados (36%);
  - trissomia do cromossoma 12: identificada em onze amostras (22%);
  - deleção do *locus* 17p13: detectada em cinco casos (10%);
  - deleção do braço longo do cromossoma 11: identificada em uma amostra (2%) e envolvendo a região compreendida entre a banda q13 a qter.

Apesar de na maioria dos trabalhos a deleção do cromossoma 17p13 não ser detectável por citogenética convencional e a trissomia do cromossoma 12 ser a mutação mais frequentemente identificada por métodos clássicos (33% dos casos), seguida de anomalias estruturais nos braços longos dos cromossomas 13 (15%), 11 (11%) e 6 (5%) [43], não se verificou a mesma ordem nem os mesmos valores de frequência destas anomalias nesta tese, o que pode estar relacionado com diferenças entre as amostras englobadas nos estudos, nomeadamente os estádios da doença em que se encontravam.

- sete amostras apresentavam simultaneamente duas das anomalias cromossómicas anteriormente mencionadas:
  - nas amostras 7 e 10 foram identificadas a trissomia do cromossoma 12 e a deleção do *locus* para o gene P53;
  - as amostras 12 e 21 apresentavam trissomia do cromossoma 12 e deleção do 13q14 (coexistência rara, segundo descrito na literatura [79], mas que já foi identificada em pelo menos um estudo pela técnica FISH, que detectou que cerca de metade dos casos com deleção do 13q14 também apresentavam um cromossoma 12 extra [59]);

- nas amostras 38, 39 e 41 foram detectadas as deleções dos *loci* 13q14 e 17p13;

Além das alterações cromossómicas mencionadas anteriormente, outras foram identificadas por citogenética convencional:

- ganho de material extra nos cromossomas 7 (amostra 2) e 21 (amostra 6);
- trissomias, nomeadamente a trissomia do cromossoma 18 em simultâneo com a trissomia 12 (amostra 4), e a trissomia do cromossoma 21 (amostra 50);
- inversão do cromossoma 11 (amostra 30);
- perda de um dos cromossomas sexuais (amostras 8, 11 e 25);
- derivativos de cromossomas (amostras 35 e 39);
- rearranjos complexos envolvendo vários cromossomas, e na maioria dos casos, o cromossoma 14 é um dos implicados (amostras 7, 10, 11 e 32).

Destas anomalias, apenas algumas foram descritas em estudos de LLC-B: o ganho de material adicional no cromossoma 7 (Schwänen, C. *et al* (2001)), normalmente identificado na banda 7q31; a trissomia do cromossoma 18 detectado em algumas das amostras de um estudo levado a cabo por Oscier, D. G. *et al* (1997); e os rearranjos envolvendo o cromossoma 14, embora estas translocações sejam normalmente associadas a casos de linfoma do manto e não a LLC-B. [50; 51; 52; 53; 54]

Em algumas neoplasias, a perda de um dos cromossomas sexuais pode estar associada a um bom prognóstico, contudo não há nenhuma referência bibliográfica que relacione esta alteração genética à LLC-B. O factor responsável por esta perda poderá ser a idade avançada.

A identificação destas anomalias reforça, uma vez mais, a importância do estudo citogenético da LLC-B, tornando possível a identificação de um a múltiplos rearranjos a partir da análise de cada metafase, o que contrasta com a visão direccionada da FISH que possibilita apenas a detecção da alteração cromossómica que se pretende pesquisar. Além disso, o método convencional permite, também, a detecção de rearranjos não descritos na literatura como associados a esta patologia, como se verificou nos exemplos citados anteriormente, o que contrasta com a técnica molecular que necessita de uma suspeita prévia de determinada alteração cromossómica na amostra em estudo, de maneira a seleccionar a sonda indicada e comprovar ou não a sua presença.

A detecção de anomalias pouco frequentes poderá suscitar a reavaliação do paciente e do estágio em que a doença se encontra, podendo ser relevante para a determinação do diagnóstico do indivíduo, com implicações no seu prognóstico e na escolha da terapia adequada, aplicada pelo clínico.

#### ⇒ FISH

O desenvolvimento da técnica FISH aumentou consideravelmente a capacidade de detectar anomalias cromossómicas, não só pela rapidez e facilidade do procedimento como também porque possibilitou a identificação das mesmas em casos que, por citogenética convencional (cujo nível de resolução é inferior à FISH), aparentavam ser de constituição genética normal. [63, 81; 89; 90]

Com os avanços da área da genética molecular, actualmente estão disponíveis sondas para a grande maioria dos *loci* específicos para diversas patologias, o que não se verifica no caso da LLC-B, cujo único gene que parece estar envolvido com a patogénese desta doença é o P53.

As sondas seleccionadas para realização desta técnica devem hibridizar com elevada eficiência, de preferência superior a 90%. As sondas centroméricas são as mais indicadas para detectar aneuploidias, uma vez que os seus fortes sinais não permitem ambiguidades, tal como se verificou neste trabalho aquando da hibridização da sonda  $\alpha$ -satélite do cromossoma 12, cujo sinal fluorescente era claramente mais forte que as sondas para os *loci* 13q14 e 17p13. Contudo, há determinados aspectos a ter em atenção quando se emprega esta técnica, nomeadamente o facto de nem sempre os sinais de hibridização representarem o número correcto de cromossomas: por vezes as sondas co-hibridizam, a organização nuclear pode levar à divisão do sinal em duas partes e a diferença no *timing* de replicação entre os homólogos pode levar à determinação do número incorrecto de cópias. Além disso, tendo em conta que o núcleo é uma entidade tridimensional, visualizá-lo a duas dimensões é uma tarefa árdua levando, por vezes, à percepção de células aparentemente monossómicas. [22]

Os protocolos fornecidos com as sondas já se encontravam optimizados pelo que não houve necessidade de alterar qualquer procedimento. Apenas se reduziu o volume das três sondas empregues, numa tentativa de rentabilizar reagentes tão dispendiosos e

tendo em conta que, apesar de utilizar menor quantidade de sonda, o sinal fluorescente emitido era igualmente forte e de fácil visualização.

Na tentativa de obtenção de lâminas de boa qualidade (de modo a permitir a hibridização das sondas com o DNA) e com a concentração desejável de núcleos e metáfases (para facilitar a contagem dos sinais fluorescentes) foi necessário investir num dos passos mais críticos da manipulação das amostras: o espalhamento. De acordo com a eficiência dos estimuladores mitogénicos empregues na cultura celular de cada amostra, assim foi utilizada a respectiva suspensão celular para preparar as lâminas para a FISH, sendo a cultura com TPA a mais frequentemente empregue.

A possibilidade de efectuar as hibridizações de cada amostra com as três sondas numa única lâmina, através do isolamento com cola das três áreas com as diferentes sondas, permitiu reduzir a quantidade de lâminas dispendidas.

Apenas três das alterações mais frequentes da LLC-B foram estudadas por FISH: trissomia do cromossoma 12 e deleções das regiões para os genes RB1 (13q14) e P53 (17p13). Em relação à análise por hibridização *in situ*, verificou-se que:

- vinte e três amostras (46%) não apresentaram nenhuma das três alterações genéticas pesquisadas por esta técnica;
- vinte e sete amostras (54%) apresentaram uma ou duas das anomalias cromossómicas em estudo.

Esta percentagem (54%) está longe do valor associado à FISH ( $\approx 80\%$ ) noutros trabalhos [6; 51; 54] no que diz respeito à identificação de anomalias cromossómicas em amostras com LLC-B. Contudo, esta discordância pode dever-se não só aos diferentes estádios da doença em que se poderiam encontrar as amostras englobadas neste trabalho em relação às dos estudos mencionados, como também se pode dever ao facto de o estudo por FISH neste projecto ter englobado apenas estas três alterações cromossómicas e não outras como as deleções dos braços longos dos cromossomas 6 e 11, por exemplo.

Com esta técnica molecular verificou-se que a deleção do cromossoma 13 foi a anomalia mais frequentemente identificada, seguida da trissomia do cromossoma 12 e da deleção do cromossoma 17:



---

**Discussão dos resultados**

---

- deleção do cromossoma 13q14: dezanove amostras positivas (38%);
- trissomia do cromossoma 12: dez amostras positivas (20%);
- deleção do cromossoma 17p13: cinco amostras positivas (10%).

A ordem de incidências das anomalias cromossómicas pesquisadas por esta técnica assemelha-se à ordem observada em outros trabalhos (não tendo em conta a deleção do 11q22-23 que não foi abrangida neste estudo), no entanto o valor das frequências difere, sendo que a deleção do *locus* 13q14 está associada na literatura uma percentagem de 55%, enquanto que a trissomia do cromossoma 12 e a deleção do *locus* 17p13 são detectados em 16% e 7% dos casos, respectivamente. [43; 78] A deleção do braço longo do cromossoma 11, não englobada neste estudo por FISH, é considerada a segunda mutação mais frequente, com uma frequência de 18%. [43; 53]

A FISH permitiu confirmar, na maioria dos casos, estas três anomalias detectadas por citogenética clássica em diversas amostras. Apenas dois casos não foram coincidentes:

- \* deleção do 13q14: a amostra 27 mostrou ser positiva por FISH para esta alteração, contudo, por métodos convencionais foi imperceptível a sua detecção;
- \* trissomia do cromossoma 12: na amostra 17, a percentagem de núcleos com três sinais detectados pela FISH foi inferior ao valor de 10%, estipulado pelo laboratório para considerar uma anomalia recorrente. Contudo, pela análise citogenética foi identificada uma metafase com um cromossoma 12 extra, tratando-se de um caso de mosaicismo de baixa incidência.

O caso da amostra 27 permite comprovar que o desenvolvimento da técnica FISH proporcionou melhorias consideráveis quanto à capacidade de detecção de anomalias cromossómicas especificamente pesquisadas por esta técnica, possibilitando a identificação de alterações subtis imperceptíveis sob a fraca resolução da citogenética convencional. No entanto, com a amostra 17 também se evidenciou o papel importante da citogenética, ao permitir detectar uma mutação que não seria considerada se apenas se efectuasse a análise de cada amostra pela técnica FISH. Neste último caso, a elevada concentração de núcleos normais nas amostras e a aleatoriedade da selecção dos núcleos observados pelo microscópio de fluorescência e contabilizados poderão ser os mecanismos responsáveis por este evento. [80]

Assim sendo, recorrer a técnicas convencionais para o estudo das amostras com esta neoplasia continua a ser um instrumento importante ao permitir a observação do cariótipo, que é uma visão global do genoma, e a detecção em simultâneo de várias anomalias a partir da observação de uma única metafase, o que contrasta com a visão direccionada da FISH.



## **Conclusão**

A citogenética clássica desempenha um papel importante na LLC-B ao permitir a análise global do cariótipo, identificando doentes com alterações genéticas de mau prognóstico e auxiliando na escolha da terapia a aplicar e na monitorização da evolução da doença e da eficácia do tratamento. [14]

O emprego de protocolos de cultura celular otimizados permitiu a obtenção de preparações cromossómicas em número e qualidade suficiente para a detecção de anomalias. Foram identificadas alterações estruturais e numéricas em trinta e três das cinquenta amostras de LLC-B em estudo.

A análise de metafases possibilitou a visão global do cariótipo, permitindo detectar não só as anomalias cromossómicas tipicamente associadas à LLC-B, como também outras não descritas na literatura como recorrentes nesta patologia. Assim sendo, salienta-se a importância dos métodos convencionais no estudo desta neoplasia, tendo em conta que permitem uma visualização generalizada da constituição genética de cada indivíduo, auxiliando o oncologista no diagnóstico de cada paciente, com implicações na determinação do seu prognóstico e da terapia a aplicar.

As técnicas de citogenética molecular, em particular a FISH, têm prestado um valioso contributo para a caracterização das alterações cromossómicas mais frequentes na LLC-B, uma vez que têm aumentado substancialmente a capacidade de detecção das mesmas. Tal facto é baseado no elevado poder de resolução da FISH e na capacidade de esta técnica ultrapassar o entrave da citogenética na obtenção de metafases de boa qualidade, tendo levado à alteração das taxas de incidência e do número de anomalias recorrentes da LLC-B anteriormente estabelecidas por métodos clássicos. Os genes envolvidos nas alterações estruturais mais comuns permanecem por identificar. O isolamento desses genes por técnicas de genética molecular poderá permitir o conhecimento dos mecanismos que levam à transformação das células normais em malignas. [14; 50; 52]

A FISH permitiu detectar em um caso deste estudo uma anomalia imperceptível por citogenética convencional. No entanto, na grande maioria das amostras denotou-se uma concordância de resultados, no que diz respeito à trissomia do cromossoma 12 e

---

## Conclusão

delecções dos *loci* 13q14 e 17p13, visto que a análise citogenética foi confirmada por FISH.

A adopção de um estudo multidisciplinar da LLC-B será a base para o sucesso da identificação de anomalias cromossómicas, para a determinação do diagnóstico e prognóstico dos pacientes, assim como para a escolha do tratamento mais indicado a aplicar. A citogenética convencional e a FISH desempenham um papel preponderante na LLC-B, e aliados aos novos avanços da genética molecular será de esperar que no futuro se obtenham mais conhecimentos e respostas acerca desta doença.

**Projecção do Projecto****Comunicações orais**

A realizar pela Dr.<sup>a</sup> Rosário Pinto Leite, com o tema “*What's New in an Old Technique to Support the Diagnosis and Monitoring of Patients with CLL?*”, no dia 23 de Junho de 2009 no Segundo Congresso Mundial sobre Cancro (Beijing, China)

- Convite em **Anexo XII**

**Submissão de um artigo a uma revista Internacional**

A aguardar revisão do artigo.

**Posters e abstracts publicados**

R. Pinto Leite, M. Souto, S. Rebelo, M. Inácio, M. Guerra, M. Cunha, E. Ribeiro; (2008); “*Avaliação de 25 pacientes com LLC-B sem tratamento por citogenética convencional e FISH por um Hospital do Interior de Portugal*”; Sociedade Portuguesa de Genética Humana; 12<sup>a</sup> Reunião Anual – Livro de Resumos P10; Instituto de Higiene e Medicina Tropical; Lisboa

- Poster em **Anexo XIII**

R. Pinto Leite, M. Souto, S. Rebelo, M. Cunha, M. Guerra, E. Ribeiro; (2008); “*Chronic lymphocytic leukemia: optimization of cytogenetic methods for detection of chromosomal alterations*”; European Society of Human Genetics; 2008-A-2043-ESHG

- Poster em **Anexo XIV**

**Referências bibliográficas**

- [1] Rai, K. R. & Gupta, N. (2003). *Chronic Leukemias: History, Epidemiology, and risk factors*, In: Schiller, G. J. (2003). *Chronic Leukemias and Lymphomas: Biology, Pathophysiology and Clinical Management*. Humana Press. Totowa (New Jersey)
- [2] Stilgenbauer, S., Lichter, P., Döhner, H. (2004). *Genetics of B-cell chronic lymphocytic leukemia*, In: Faguet, G. B. (2004). *Chronic Lymphocytic Leukemia – Molecular genetics, biology, diagnosis and management*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [3] Rozman C. & Montserrat E. (1995). *Chronic lymphocytic leukemia*. N. Engl. J. Med. 333: 1052-1057
- [4] Michaux L. et al. (2005). *Translocation t(1;6)(p35.3;p25.2): a new recurrent aberration in “unmutated” B-CLL*. Leukemia 19, 77-82
- [5] Matutes, E. & Polliack, A. (2000). *Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia*. Rev. Clin. Exp. Hematol.(1): 22-47
- [6] Stilgenbauer S., Lichter P., Döhner H. (2000). *Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Rev. Clin. Exp. Hematol. (1): 48-72
- [7] Molica S., et al. (1995). *Prognostic features and therapeutical approaches in B-cell chronic lymphocytic leukemia: an update*. Haematologica 80: 176-193
- [8] Novak U. et al. (2002). *A high-resolution allelotype of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Blood, 100: 1787-1794
- [9] Dicker F., et al. (2006). *Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV<sub>H</sub> status, and CD38 expression*. Blood 108: 3152-316

- [10] Montserrat, E., Bosch, F., Rozman, C. (1997). *B-cell chronic lymphocytic leukemia: Recent progress in biology, diagnosis, and therapy*. Annals of Oncology 8 (Suppl. 1): S93-S101
- [11] Eclache V. et al. (2002). *A constitutional translocation t(1;4)(p21;p15) in a case of chronic lymphocytic leukemia*. Annales de Génétique 45: 169-171
- [12] Lawce, H. J. & Brown, M. G. (1997). *Cytogenetics – An Overview*, In: Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia
- [13] Schulz-Scaeffler, J. (1980). *Cytogenetics: Plants, Animals, Humans*. Springer. New York
- [14] Chauffaille, M. L. (2005). *Citogenética e biologia molecular em leucemia linfocítica crónica*. Ver. Bras. Hematol. Hemoter. 27(4): 247-252
- [15] Roulston D. & Le Beau, M. (1997). *Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases*. In: Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia
- [16] Rabbits, T. H. (1994). *Chromosomal translocations in human cancer*. Nature 372(6502): 143-9
- [17] Yunis, J. J. (1983). *The chromosomal basis of human neoplasia*. Science 221(4607): 227-36
- [18] Rowley, J. D. (1980). *General report on the Second International Workshop on Chromosomes in Leukemia*. Int. J. Cancer 26(5): 531-3
- [19] Lacadena, J. R. (1996). *Citogenética*. Editorial Complutense, S.A. Madrid
- [20] Waters, J. J., Barlow, A. L., Gould, C. P. (1998). *Demystified...FISH*. J. Clin. Pathol. Mol. Pathol. 51: 62-70
- [21] Fan, Y. (2002). *Methods in Molecular Biology (Volume 204) Molecular Cytogenetics – Protocols and applications*. Humana Press. Totowa

- [22] Kearney, L. & Buckle, V. J. (2001). *The application of fluorescence in situ hybridization to chromosome analysis*, In: Rooney, D. E. (2001). *Human Cytogenetics – Constitutional analysis 3<sup>rd</sup> Edition*. Oxford University Press
- [23] Montgomery, K. D., Keitges, E. A., Meyne, J. (1997). *Molecular Cytogenetics: Definitions, clinical aspects, and protocols*, In: Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia
- [24] Lichter P., Ward D. C. (1990). *Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age?*. Nature 345: 93-94
- [25] Hopman, A. et al. (1992). *Interphase cytogenetics - An approach in the detection of genetic aberrations in cancers*. Oxford University Press. Oxford
- [26] Landegent, J. E. et al. (1985). *Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization*. Nature 317, 175 – 177
- [27] Rooney, D. E. & Czepulkowski, B. H. (1997). *Human Cytogenetics: a practical approach*. IRL Press Ltd. Oxford
- [28] Regateiro, F. J. (2003). *Manual de genética médica*. Imprensa da Universidade de Coimbra
- [29] Divane, A., et al. (1994). *Rapid prenatal diagnosis of aneuploidy from uncultured amniotic fluid cells using five-colour fluorescence in situ hybridization*. Prenat. Diagn. 14: 1061-1069
- [30] Lin, P. & Medeiros, J. (2005). *Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias*, In: Coleman, W. B. & Tsongalis, G. J. (2005). *Molecular Genetic Abnormalities in Acute and Chronic Leukemias in Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian 2<sup>nd</sup> Edition*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [31] Schulz, W. A. (2005). *Molecular Biology of Human Cancers, An Advanced Student's Textbook*. Springer. Netherlands. pp: 219-242

- [32] Rai, K. R. & Wasil, T. (2001). *History of chronic lymphocytic leukemia*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2nd Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [33] Marti, G. & Zenger, V. (2004). *The natural history of CLL*, In: Faguet, G. B. (2004). *Chronic Lymphocytic Leukemia – Molecular genetics, biology, diagnosis and management*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [34] Goldsby, R. A., et al. (2002). *Immunology 5<sup>th</sup> Edition*. W.H. Freeman. New York
- [35] Roitt, I., Brostoff, J., Male D. (2001). *Immunology 6<sup>th</sup> Edition*. Mosby. Spain
- [36] Chiorazzi, N. & Ferrarini, M. (2001). *Immunoglobulin variable region gene characteristics and surface membrane phenotype define B-CLL subgroups with distinct clinical courses*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [37] Crossen, P. E. (1997). *Genes and chromosomes in chronic B-cell leukemia*. Cancer Genet. Cytogenet. 94: 44-51
- [38] Hamblin, T. (2004). *The heterogeneous origin of the B-CLL cell*, In: Faguet, G. B. (2004). *Chronic Lymphocytic Leukemia – Molecular genetics, biology, diagnosis and management*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [39] Ghia, P. & Caligaris-Cappio, F. (2001). *The origin and nature of the chronic lymphocytic leukemia lymphocyte*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [40] Melchers, F. (2005). *B cell development and its deregulation to transformed states at the pre-B cell receptor-expressing pre-BII cell stage*. Current Topics in Microbiology and Immunology 294: 1-17
- [41] Kurosaki, T. (1999). *Genetic analysis of B cell antigen receptor signalling*. Annu. Rev. Immunol. 17: 555-592



- [42] Bullrich, F. & Croce, C. M. (2001). *Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- [43] Cavenagh, J. D. & Lister, T. A. (2003). *Chronic Lymphocytic Leukemia: Diagnosis and management*, In: Schiller, G. J. (2003). *Chronic Leukemias and Lymphomas: Biology, Pathophysiology and Clinical Management*. Humana Press. Totowa (New Jersey)
- [44] Dighiero, G. (2004). *Guidelines for clinical management of CLL*, In: Faguet, G. B. (2004). *Chronic Lymphocytic Leukemia – Molecular genetics, biology, diagnosis and management*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [45] Wierda, W. (2004). *Molecular biology of chronic lymphocytic leukemia*, In: Faguet, G. B. (2004). *Chronic Lymphocytic Leukemia – Molecular genetics, biology, diagnosis and management*. Humana Press. Totowa, New Jersey
- [46] Molica, S. (2001). *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York
- [47] Lin, T. S. & Byrd, J. C. (2006). *Chronic lymphocytic leukemia and related chronic leukemias*, In: Chang, A. E. et al. (2006). *Oncology – An Evidence-Based Approach*. Springer. New York
- [48] Deans, J. & Polyak, M. (2008). *Correspondence: FMC7 is an epitope of CD20*. Blood, Vol. 111, No. 4, pp. 2492
- [49] Sgambati, M. T., Linet, M. S., Devesa, S. S. (2001). *Chronic lymphocytic leukemia: Epidemiological, familial, and genetic aspects*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York
- [50] Stilgenbauer, S., Lichter, P., Döhner, H. (2001). *Genomic aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia*, In: Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2<sup>nd</sup> Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York



- [51] Stilgenbauer, S. *et al.* (2002). *Genetics of chronic lymphocytic leukemia: genomic aberrations and V<sub>H</sub> gene mutation status in pathogenesis and clinical course.* Leukemia 16: 993-1007
- [52] Stilgenbauer, S. *et al.* (1998). *Molecular cytogenetic analysis of B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Ann. Hematol. 76: 101-110
- [53] Döhner, H. *et al.* (1999). *Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis.* J. Mol. Med. 77: 266-281
- [54] Kipps, T. J. (2000). *Genetics of chronic lymphocytic leukaemia.* Hematol. Cell. Ther. 42: 5-14
- [55] Godon, A. *et al.* (2003). *Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients.* Leukemia 17: 255-259
- [56] Abbott, B. L. (2006). *Chronic lymphocytic leukemia: Recent advances in diagnosis and treatment.* The Oncologist 11: 21-30
- [57] Klein, U. & Dalla-Favera, R. (2005). *New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia.* Current Topics in Microbiology and Immunology 294: 31-49
- [58] Tamarin, R. H. (2002). *Principles of Genetics 7<sup>th</sup> Edition.* McGraw-Hill. New York
- [59] Navarro, B., *et al.* (1998). *Association and clonal distribution of trisomy 12 and 13q14 deletions in chronic lymphocytic leukaemia.* Br. J. Haematol.; 102: 1330-1334
- [60] Brugiattelli, M., *et al.* (2006). *Management of chronic lymphocytic leukemia: practice guidelines from the Italian Society of Hematology, the Italian Society of experimental hematology and the Italian group for bone marrow transplantation.* Haematologica 91: 1662-1673

- [61] Cheson, B. D. et al. (1996). *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment*. Blood, 87: 4990-4997
- [62] Brown, M. G. & Lawce, H. J. (1997). *Cytogenetics – Peripheral blood cytogenetic methods*, In: Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia
- [63] Verma, R. S. & Babu, A. (1995). *Human Chromosomes – Principles and Techniques 2<sup>nd</sup> Edition*. McGraw-Hill. USA
- [64] Drexler H. G., et al. (1987). *Synergistic Action of Calcium ionophore A23187 and Phorbol Ester TPA on B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells*. Blood, Vol. 70, pp: 1536-1542
- [65] Herschman, H. R. (1985). *A 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate (TPA)-Nonproliferative Variant of 3T3 Cells Is Resistant to TPA-Enhanced Gene Amplification*. Molecular and Cellular Biology, pp. 1130-1135
- [66] Okamura J., Gelfand E. W. & Letarte M. (1982). *Heterogeneity of the response of chronic lymphocytic leukemia cells to phorbol ester*. Blood. Vol. 60: 1082-1088
- [67] Glade, P. R. (1967). *Identification of the Pokeweed Mitogen in Africa*. Nature 216, 795 – 796
- [68] Yen A., et al. (1985). *Myeloid Differentiation-inducing Factors Produced by Pokeweed Mitogen treated Normal G1/0 Lymphocytes but not Chronic Lymphocytic Leukemia Cells*. Cancer Research Vol. 45: 4060-4066
- [69] Hammerstrom S., et al. (1982). *Mitogenic leukoagglutinin from Phaseolous vulgaris binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1611-1615

- [70] Leavitt R. D., Felsted R. L. & Bachur N. R. (1977). *Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris isolectins*. J.B.C., Vol. 252, Issue 9, 2961-2966
- [71] Melchers F., Coutinho A., Heinrich G., Andersson J. (2006). *Continuous Growth of Mitogen-Reactive B Lymphocytes*. Scandinavian Journal of Immunology, Volume 4, Issue 7, pp. 853 – 858
- [72] Mayer, H. et al. (1985). *Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria*. Methods in Microbiology 18, 157-207
- [73] Skidmore B. J., et al. (1975). *Immunologic properties of bacterial lipopolysaccharide (LPS): correlation between the mitogenic, adjuvant, and immunogenic activities*. J. Immunol. 114 (2 pt 2): 770-5
- [74] Priest, J. H. (1997). *General cell culture principles and fibroblast culture*, In: Barch, M. J., Knutsen, T., Spurbeck J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual 3<sup>rd</sup> Edition*. Lippincott-Raven. Philadelphia
- [75] Trask, B. J. (1991). *Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping*. T.I.G., 7: 149-154
- [76] Rebelo, S. (2008). *Optimização de técnicas de citogenética convencional na Leucemia Linfocítica Crónica-B e citogenética molecular*. Laboratório de Citogenética, Serviço de Genética, Centro de Diagnóstico Pré-Natal do Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, E.P.E. Vila Real
- [77] Clouston, H. J. (2001). *Lymphocyte culture*, In: Rooney, D. E. (2001). *Human Cytogenetics – Constitutional analysis 3<sup>rd</sup> Edition*. Oxford University Press. Oxford
- [78] Döhner, H. et al (1997). *Cytogenetic and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lymphocytic leukemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes*. Leukemia Vol. 11, Sup. 2, pp. S19-S24

- [79] Xu, W. et al (2007). *Interphase fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. Int. J. Hematol. 85: 430-436
- [80] Aoun, P. et al (2004). *Fluorescence in situ hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma*. Leukemia & Lymphoma vol.45 (8), pp. 1595-1603
- [81] Dorritie K., et al. (2004). *Advanced Molecular Cytogenetics in Mouse and Human (Fish, Sky and CGH)*. Expert Rev. Mol. Diagn. 4(5): 663-76

**Sites consultados**

- [82] Wikipedia: The Free Encyclopedia – Antigen  
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Antigen>)
- [83] Wikipedia: The Free Encyclopedia – Interleucina  
(<http://pt.wikipedia.org/wiki/Interleucina>)
- [84] Wikipedia: The Free Encyclopedia – Imunoglobulina  
(<http://pt.wikipedia.org/wiki/Imunoglobulina>)
- [85] Mondofacto Online Medical Dictionary –  
(<http://www.mondofacto.com/facts/dictionary>)
- [86] Wikipedia: The Free Encyclopedia – Mitogen  
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Mitogen>)
- [87] Steady Health Encyclopedia – Pokeweed Mitogen  
([http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Pokeweed\\_mitogen](http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Pokeweed_mitogen))
- [88] Wikipedia: The Free Encyclopedia – Lipopolysaccharide  
(<http://en.wikipedia.org/wiki/Lipopolysaccharide>)
- [89] Wikipedia: The Free Encyclopedia - Fluorescent *in situ* hybridization  
([http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent\\_in\\_situ\\_hybridization](http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescent_in_situ_hybridization))

- [90] Cytogenetics: Fluorescent *in situ* hybridization  
(<http://members.aol.com/chrominfo/fishinfo.htm>)
- [91] Chromosomes ideograms: (<http://www.biologia.uniba.it/rmc/0-internal-images/z-ideograms/ideograms.html>)
- [92] Chromosomes ideograms: ([www.csmc.edu/csri/korenberg/int-bac-sts.html](http://www.csmc.edu/csri/korenberg/int-bac-sts.html))

**Anexos****Anexo I – Protocolo da cultura celular com TPA (protocolo A)****Soluções:**

- Meio Karyomax;
- Colcemide na concentração final de 10 µg / ml;
- Solução hipotónica de cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada. Guardar no frigorífico, a 4 °C;
- Fixador 3:1, metanol: ácido acético. Usar fresco;
- TPA na concentração final de 50 ng/ml. Diluir 1 mg de reagente em 20 ml de etanol absoluto ([Solução-mãe] = 1 mg/ 20 ml). Distribuir esta solução por 20 alíquotas de 1 ml (cada uma delas com uma concentração de 0,05 mg/ml ou 50 mg/ml). Para obter a solução de trabalho, diluir 10x uma alíquota de 1 ml (obtendo a concentração 5 mg/ml).

**Sementeira:**

1. Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;
2. Adicionar 50 µl de uma alíquota de TPA diluída 10x e 5 gotas da amostra.
3. Homogeneizar, levemente, o tubo;
4. Incubar durante 71 horas a 37 °C;
5. Adicionar a cada tubo 3 gotas de colcemide e homogeneizar;
6. Incubar durante 60 minutos a 37 °C;

**Manipulação:**

7. Centrifugar o tubo durante 10 minutos a 1000 rpm;
8. Rejeitar o sobrenadante;
9. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a 37 °C;
10. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
11. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;

12. Rejeitar o sobrenadante;
13. Adicionar, lentamente e sob agitação, o fixador 3:1, previamente refrigerado;
14. Incubar durante 15 minutos na arca a  $-20^{\circ}\text{C}$ ;
15. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
16. Repetir a adição do fixador 3:1 até o fixador aparecer claro.

## **Anexo II – Protocolo da cultura celular com pokeweed (protocolo C)**

### **Soluções:**

- Meio Karyomax;
- Colcemide na concentração final de  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ ;
- Solução hipotónica de cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada. Guardar no frigorífico, a  $4^{\circ}\text{C}$ ;
- Fixador 3:1, metanol: ácido acético. Usar fresco;
- Pokeweed na concentração final de  $20\text{ ng/ml}$ . Dissolver 5 mg de reagente em 5 ml de NaCl 0,9%.

### **Sementeira:**

1. Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;
2. Adicionar  $100\text{ }\mu\text{l}$  das alíquotas preparadas de pokeweed e 5 gotas da amostra.
3. Homogeneizar, levemente, o tubo;
4. Incubar durante 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ;
5. Adicionar a cada tubo 3 gotas de colcemide e homogeneizar;
6. Incubar durante 60 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ ;

### **Manipulação:**

7. Centrifugar o tubo durante 10 minutos a 1000 rpm;
8. Rejeitar o sobrenadante;
9. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$ ;

10. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
11. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
12. Rejeitar o sobrenadante;
13. Adicionar, lentamente e sob agitação, o fixador 3:1 previamente refrigerado;
14. Incubar durante 15 minutos na arca a -20 °C;
15. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
16. Repetir a adição do fixador 3:1 até o fixador aparecer claro.

### **Anexo III – Protocolo da cultura celular com PHA-M (protocolo D)**

#### **Soluções:**

- Meio Karyomax;
- Colcemide na concentração final de 10 µg / ml;
- Solução hipotónica de cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada. Guardar no frigorífico, a 4 °C;
- Fixador 3:1, metanol: ácido acético. Usar fresco;
- PHA-M na concentração final de 20 ng/ml. Dissolver 5 mg de reagente em 5 ml de água esterilizada. O produto reconstituído pode ser, depois, diluído até à concentração desejada, antes de usar com o tampão estéril. Deve-se filtrar antes de usar em cada trabalho, de modo a prevenir perdas do produto.

#### **Sementeira:**

1. Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;
2. Adicionar 100 µl das alíquotas preparadas de PHA-M e 5 gotas da amostra. Homogeneizar, levemente, o tubo;
3. Incubar durante 72 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>;
4. Adicionar a cada tubo 3 gotas de colcemide e homogeneizar;
5. Incubar durante 60 minutos a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>;



**Manipulação:**

6. Centrifugar o tubo durante 10 minutos a 1000 rpm;
7. Rejeitar o sobrenadante;
8. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a 37 °C;
9. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
10. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
11. Rejeitar o sobrenadante;
12. Adicionar, lentamente, e sob agitação o fixador 3:1, previamente refrigerado;
13. Incubar durante 15 minutos na arca a -20 °C;
14. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
15. Repetir a adição do fixador 3:1 até o fixador aparecer claro.

**Anexo IV – Protocolo da cultura celular com LPS (protocolo L)****Soluções:**

- Meio Karyomax;
- Colcemide na concentração final de 10 µg / ml;
- Solução hipotónica de cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada. Guardar no frigorífico, a 4 °C;
- Fixador 3:1, metanol: ácido acético. Usar fresco;
- Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* 055:B5 na concentração final de 40 mg / ml. Diluir 4 mg de reagente em 20 ml de água esterilizada (Solução-stock de concentração 4 mg/ 20 ml). Distribuir esta solução por 20 alíquotas de 1 ml (cada uma delas com uma concentração de 0,2 mg/ml ou 200 mg/ ml). Para obter a concentração desejada do mitogéneo, retirar o volume total da alíquota (1 ml) para adicionar ao meio de cultura.

**Sementeira:**

1. Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;
2. Adicionar 1ml das alíquotas preparadas de lipopolissacarídeos e 5 gotas da amostra. Homogeneizar, levemente, o tubo;
3. Incubar durante 5 dias a 37 °C;
4. Adicionar a cada tubo 3 gotas de colcemide e homogeneizar;
5. Incubar durante 1 hora a 37 °C;

**Manipulação:**

6. Centrifugar o tubo durante 10 minutos a 1000 rpm;
7. Rejeitar o sobrenadante;
8. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a 37 °C;
9. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
10. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
11. Rejeitar o sobrenadante;
12. Adicionar, lentamente e sob agitação, o fixador 3:1, previamente refrigerado;
13. Incubar durante 15 minutos na arca a -20 °C;
14. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
15. Repetir a adição do fixador 3:1 até o fixador aparecer claro.

**Anexo V - Protocolo da cultura celular sem adição de mitogéneo (protocolo B)****Soluções:**

- Meio Karyomax;
- Colcemide na concentração final de 10 µg / ml;
- Solução hipotónica de cloreto de potássio 0.075 M. Dissolver 5.6 g de KCl em 1 litro de água destilada. Guardar no frigorífico, a 4 °C;
- Fixador 3:1, metanol: ácido acético. Usar fresco.

**Sementeira:**

1. Distribuir por cada tubo 5 ml de meio completo;
2. Adicionar 5 gotas da amostra. Homogeneizar, levemente, o tubo;
3. Incubar durante 71 horas a 37 °C;
4. Adicionar a cada tubo 3 gotas de colcemide e homogeneizar;
5. Incubar durante 60 minutos a 37 °C;

**Manipulação:**

6. Centrifugar o tubo durante 10 minutos a 1000 rpm;
7. Rejeitar o sobrenadante;
8. Adicionar, lentamente, a cada tubo, 10 ml da solução hipotónica, previamente, aquecida a 37 °C;
9. Incubar durante 15 minutos a 37 °C;
10. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
11. Rejeitar o sobrenadante;
12. Adicionar, lentamente e sob agitação, o fixador 3:1, previamente refrigerado;
13. Incubar durante 15 minutos na arca a -20 °C;
14. Centrifugar durante 10 minutos a 1000 rpm;
15. Repetir a adição do fixador 3:1 até o fixador aparecer claro.

**Anexo VI – Protocolo do espalhamento**

1. Agitar a suspensão celular;
2. Colocar 2 gotas de suspensão celular sobre a lâmina;
3. Secar as lâminas sobre uma placa de aquecimento à temperatura aproximada de 60 °C;
4. Para envelhecer as lâminas, conservá-las durante 30 minutos, sobre a placa de aquecimento;
5. Colocar as lâminas à temperatura ambiente até ao bandejamento. Antes do bandejamento pode-se observar as lâminas em contraste de fase ou coradas com

Giemsa a 10% durante 3 minutos, para visualizar o número de metafases e a qualidade do espalhamento.

### **Anexo VII – Protocolo da técnica de bandeamento GTL**

#### **Soluções:**

- Solução salina (NaCl) a 0.9%. Dissolver 9 g de NaCl em 1 litro de água destilada;
- Solução de tripsina. Adicionar 1 ml de tripsina a 60ml de solução salina;
- Corante Leishman (solução-mãe). Dissolver 0.3g de corante Leishman em 200 ml de metanol. Homogeneizar “*overnight*”, na placa a 70 °C, posteriormente filtrar;
- Corante Leishman (solução de trabalho). Adicionar 8 ml da solução-mãe de corante a 40 ml de tampão Gurr;
- Tampão Gurr. Dissolver uma pastilha de tampão Gurr em 1litro de água destilada. Armazenar no frigorífico, a 4 °C.

#### **Procedimento:**

1. Colocar a lâmina na solução de tripsina, à temperatura ambiente; Nota: A tripsina é uma enzima proteolítica que vai desnaturar as proteínas do DNA, pelo que o tempo de tripsina varia para cada caso.
2. Lavar as lâminas em solução salina, à temperatura ambiente;
3. Transferir a lâmina para um coplin com tampão Gurr, à temperatura ambiente;
4. Colocar a lâmina na horizontal e adicionar corante Leishman (solução de trabalho), e incubar durante 3 minutos;
5. Lavar a lâmina em tampão Gurr, à temperatura ambiente;
6. Transferir a lâmina para um coplin com água destilada, à temperatura ambiente;
7. Secar a lâmina;
8. Observar ao microscópio óptico.

**Anexo VIII – Sonda  $\alpha$ -satélite para o cromossoma 12 (VYSIS)****Soluções:**

- Solução 2X SSC. Adicionar 50 ml de 20X SSC a 450 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução 0,4X SSC. Adicionar 10 ml de 20X SSC a 490 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução de lavagem I (0,4X SSC/ 0,3% NP-40). Adicionar 150  $\mu$ l NP-40 a 50ml de 0,4X SSC;
- Solução de lavagem II (2X SSC/ 0,1% NP-40). Adicionar 50  $\mu$ l NP-40 a 50ml de 2X SSC.

**Nota:** O NP-40 pode ser substituído pelo Igepal

**Procedimento:****a) Envelhecimento da lâmina**

1. Após o espalhamento, colocar a lâmina na placa a 60 °C, pelo menos durante 1 hora.

**b) Preparação da sonda**

2. Deixar a sonda descongelar à temperatura ambiente. Adicionar num *eppendorf*, 2  $\mu$ l de sonda;
3. Vortex e centrifugar durante 2-3 seg.;

**c) Co-desnaturação da amostra/sonda**

4. Aplicar 2  $\mu$ l da sonda, na área pretendida e cobrir com uma lamela;
5. Desnaturar a sonda e a amostra, colocando a lâmina numa placa de aquecimento a 75 °C, durante 5 min.

**d) Hibridização**

6. Incubar a lâmina a 37 °C, numa caixa húmida, durante  $\pm$  12 horas (preferencialmente na estufa).

**e) Lavagem rápida**

7. Retirar, cuidadosamente, a lamela;
8. Colocar a lâmina no coplin com a solução de lavagem I, a 73 °C, e incubar durante 2 minutos;
9. Transferir a lâmina para o coplin com a solução de lavagem II, à temperatura ambiente, e incubar durante 1 minuto.

**f) Contraste**

10. Deixar secar a lâmina ao ar, no escuro;
11. Aplicar 8 µl de contrastante (DAPI/Antifade);
12. Cobrir com uma lamela e guardar a lâmina no frigorífico;
13. Observar os resultados num microscópio de epi-fluorescência.

**Anexo IX – Sonda para a região codificadora do gene retinoblastoma (RB1) (VYSIS)****Soluções:**

- Solução 2X SSC. Adicionar 50 ml de 20X SSC a 450 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução 0,4X SSC. Adicionar 10 ml de 20X SSC a 490 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução de lavagem I (0,4X SSC/ 0,3% NP-40). Adicionar 150 µl NP-40 a 50ml de 0,4X SSC;
- Solução de lavagem II (2X SSC/ 0,1% NP-40). Adicionar 50 µl NP-40 a 50ml de 2X SSC.

**Procedimento:****a) Envelhecimento da lâmina**

1. Após o espalhamento, colocar a lâmina na placa a 60 °C, pelo menos durante 1 hora.

**b) Preparação da sonda**

2. Adicionar num *ependorf* os seguintes reagentes:

- 7 µl solução de hibridização;
- 1 µl sonda;
- 2 µl água esterilizada.

3. Vortex e centrifugar durante 2-3 seg.;

**c) Co-desnaturação da amostra/sonda**

4. Aplicar 10 µl da sonda, na área pretendida e cobrir com uma lamela;

5. Desnaturar a sonda e a amostra, colocando a lâmina numa placa de aquecimento a 75 °C, durante 5 min.

**d) Hibridização**

6. Incubar a lâmina a 37 °C, numa caixa húmida, durante ± 12 horas (preferencialmente na estufa).

**e) Lavagem rápida**

7. Retirar, cuidadosamente, a lamela;

8. Colocar a lâmina no coplin com a solução de lavagem I, a 73 °C, e incubar durante 2 minutos;

9. Transferir a lâmina para o coplin com a solução de lavagem II, à temperatura ambiente, e incubar durante 1 minuto.

**f) Contraste**

10. Deixar secar a lâmina ao ar, no escuro;

11. Aplicar 8 µl de contrastante (DAPI/Antifade);

12. Cobrir com uma lamela e guardar a lâmina no frigorífico;

13. Observar os resultados num microscópio de epi-fluorescência.

**Anexo X – Sonda para a região codificadora do gene p53 (VYSIS)****Soluções:**

- Solução 2X SSC. Adicionar 50 ml de 20X SSC a 450 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução 0,4X SSC. Adicionar 10 ml de 20X SSC a 490 ml de H<sub>2</sub>O destilada e ajustar o pH a 7;
- Solução de lavagem I (0,4X SSC/ 0,3% NP-40). Adicionar 150 µl NP-40 a 50ml de 0,4X SSC;
- Solução de lavagem II (2X SSC/ 0,1% NP-40). Adicionar 50 µl NP-40 a 50ml de 2X SSC.

**Procedimento:****a) Envelhecimento da lâmina**

1. Após o espalhamento, colocar a lâmina na placa a 60 °C, pelo menos durante 1 hora.

**b) Preparação da sonda**

2. Adicionar num *ependorf* os seguintes reagentes:
  - 7 µl solução de hibridização;
  - 1 µl sonda;
  - 2 µl água esterilizada.
3. Vortex e centrifugar durante 2-3 seg.;

**c) Co-desnaturação da amostra/sonda**

4. Aplicar 10 µl da sonda, na área pretendida e cobrir com uma lamela;
5. Desnaturar a sonda e a amostra, colocando a lâmina numa placa de aquecimento a 75 °C, durante 5 min.



**d) Hibridização**

6. Incubar a lâmina a 37 °C, numa caixa húmida, durante  $\pm$  12 horas (preferencialmente na estufa).

**e) Lavagem rápida**

7. Retirar, cuidadosamente, a lamela;
8. Colocar a lâmina no coplin com a solução de lavagem I, a 73 °C, e incubar durante 2 minutos;
9. Transferir a lâmina para o coplin com a solução de lavagem II, à temperatura ambiente, e incubar durante 1 minuto.

**f) Contraste**

10. Deixar secar a lâmina ao ar, no escuro;
11. Aplicar 8  $\mu$ l de contrastante (DAPI/Antifade);
12. Cobrir com uma lamela e guardar a lâmina no frigorífico;
13. Observar os resultados num microscópio de epi-fluorescência.



**Anexo XI – Folha de cultura das amostras de LLC-B**

Amostra n° \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_

Data de receção \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sangue (SL) \_\_\_\_\_

Medula Ossea (MO) \_\_\_\_\_

Observações \_\_\_\_\_

Tubo	Sementeira							Nº de gotas de Colcemide (dia/hora)
	Dia	Hora	Meio de cultura	Nº de gotas de amostra	5% CO <sub>2</sub>	Estimulador mitogénico		
A					-----	TPA	50µl	
B					-----	-----	-----	
C						Pkw	100 µl	
D						Pha-M	100 µl	
L					-----	LPS	1 ml	

**Anexo XII – Convite para Comunicação Oral a realizar em Beijing (China) no Segundo Congresso Mundial sobre Cancro (23 de Junho de 2009)**

BIT Life Sciences' 2<sup>nd</sup>



## World Cancer Congress 2009

Theme: Gateway to Future Medicine

Time: June 22-25, 2009

Venue: Beijing International Convention Center, China

Website: <http://www.bitlifesciences.com/cancer2009/>

### Invitation letter

April 20, 2009

Dear Dr. Rosário Pinto Leite,

BIT Life Sciences and Organizing Committee are organizing the 2<sup>nd</sup> World Cancer Congress as part of their dedication to offer professionals in cancer field a multidisciplinary platform to learn about the latest scientific updates and current industry standards in cancer treatment. The congress with the theme "The Gateway to Future Medicine" will be held during June 22-25, 2009, Beijing, China. On behalf of the Organizing Committee, we are pleased to inform you that we have accepted your abstract and welcome you to give a speech in the Session 2-4: Hematology-Oncology, with the topic: *What's New in an Old Technique to Support the Diagnosis and Monitoring of Patients with CLL?*

The aims of the congress are to provide a high quality program designed to attract delegates from all cancer research disciplines & anti-cancer medicine development, and encourage these researchers to interact and in some cases forge new collaborations. The 2009 program will be a great showcase for the talents and a wonderful opportunity to hear talks from renowned overseas speakers after our success last one 2008. More than 350 invited cancer specialists from a wide range of disciplines will participate in the Scientific Program and their presentations will provide delegates with information on the latest developments in basic science and clinical treatment.

The 2<sup>nd</sup> World Cancer Congress is designed to:

- \* Hear and discuss the most exciting research discoveries in cancer field—in detail
- \* Gain a broad view of research in the field with 350+ oral Presentation
- \* Network with senior scientists, executives and others over 42 Scientific and Technical Sessions
- \* See friends and colleagues from 1000 delegates around the world
- \* Visit over 80 commercial and nonprofit exhibits offering new products and services

For 2009, we aim to deliver a better event and I very much hope that you will be there to contribute to what becomes the most important conference for cancer researcher in China. We look forward to seeing you in Beijing for a stimulating and enjoyable conference.

Sincerely yours,



Xiaodan Mei, Ph.D.

Executive Chair of World Cancer Congress-2009

26 Gaoneng Street, R401, Qixianling

Dalian Hightech Zone

Dalian, LN 116025, China

CC: Annie Sun

Chief Technology Officer

Tel: 0086-411-84799479 Fax: 0086-411-84799629 E-mail: [Annie@canceroon.com](mailto:Annie@canceroon.com)



## Anexo XIII – Poster exposto na 12ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Genética (20-22 Novembro 2008)

### Avaliação por citogenética convencional e FISH de 25 doentes não tratados com LLC-B num Hospital do interior



Rosário Pinto Leite\*, Marta Souto\*, Sandra Rebelo\*, Manuel Cunha\*\*, Marisol Guerra\*\*, Margarida Costa\*\*, Eufémia Ribeiro\*

\*Serviço de Genética, CDPN, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE, Vila Real, Portugal

\*\* Serviço de Hematologia, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE, Vila Real, Portugal

#### Introdução

A leucemia linfocítica crónica (LLC) é a forma de leucemia mais comum dos países ocidentais. A leucemia dos linfócitos B é a variante mais frequente, constituindo cerca de 95% de todos os casos de LLC. (Cheson, 2001)

É uma doença clonal linfoproliferativa caracterizada pela proliferação anormal e acumulação de linfócitos morfológicamente pequenos e imunofenotipicamente maduros. (Matutes & Polliack, 2000).

A análise citogenética no estudo da LLC-B é importante, permitindo detectar alterações cromossómicas associadas a este tipo de leucemia, nomeadamente, a trissomia do cromossoma 12, deleções nos *loci* localizados nos cromossomas 13q14, 11q22-q23, 17p13 e 6q21, com implicações prognósticas e, por vezes, terapêuticas (Döhner *et al*, 1999; Stilgenbauer *et al*, 2000)

#### Material e Métodos

➢ 25 amostras de sangue periférico de pacientes com LLC-B.

➢ Cultura e manipulação das amostras de acordo com protocolos otimizados pelo laboratório. Bandagem GTL.

➢ Análise citogenética efectuada de acordo com as regras internacionais de nomenclatura (ISCN, 2005).

➢ Técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) com as sondas  $\alpha$ -satélite do cromossoma (#) 12 e de sequência única do #13q14 (RB1) e do #17p13 (p53) (VYSIS).

#### Resultados

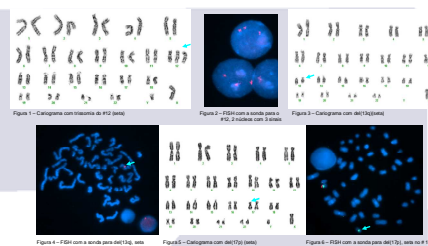
- ✓ Obtiveram-se metafases na totalidade das amostras de sangue periférico (Tabela1).
- ✓ Dos 25 casos de LLC estudados, 11 tiveram resultados normais (por citogenética e FISH).
- ✓ Todos os casos com trissomia 12 detectados por citogenética (7 casos) foram confirmados pelo FISH (Fig 1 e 2).
- ✓ Dos 8 casos com del(13q), 3 foram detectados pela citogenética e por FISH, e 5 apenas por FISH (Fig. 3 e 4).
- ✓ O caso nº 8 apresenta del(17p) detectada pela citogenética e confirmada por FISH, enquanto que no caso 19 apenas o FISH detectou a deleção (Fig. 5 e 6).
- ✓ Em dois casos detectou-se a trissomia 12 e a del (17p) (casos 8 e 19)
- ✓ Em 3 casos a citogenética deu uma informação adicional:
  - Caso 6 – tem duas trissomias nas metafases analisadas;
  - Caso 13 – em 13 metafases observaram-se duas translocações;
  - Caso 19 – em todas as metafases existia uma translocação.

Tabela 1 – Resultados citogenéticos e por FISH nas 25 amostras de LLC.

Amostra	Resultados de citogenética				Resultados FISH		
	Metáfases normais	+12	del(13q)	del(17p)	Outras anomalias	Total Metáf.	del(17p)
1	54					54	0%
2	39	1				40	58.8%
3	15					15	0%
4	28					28	1.43%
5	12					12	0%
6	38	12			+12+18(12)	50	52.10%
7	22					22	0%
8	17	2		5		24	41.8%
9	23					23	0%
10	32					32	2.4%
11	16					16	0%
12	4		12			16	0%
13	4				(14)(3)(14)(14)(5)(13)	17	0%
14	16					16	0%
15	1	11				12	71.2%
16	22					22	0%
17	19					19	3.1%
18	25					25	0%
19	2				(7)(14)(12)(3)	3	77%
20	15					15	0%
21	16	5				21	96.2%
22	29		1			30	0%
23	32					32	0%
24	18	13				31	88.4%
25	17					17	0%

#### Bibliografia

- Cheson, B. D. (2001). *Chronic Lymphoid Leukemias 2nd Edition*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Döhner H., Stilgenbauer S., Döhner K., Bentz M. & Lichter P. (1999). Chromosome alterations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *Journal of Molecular Medicine* Volume 77, Number 2: 266-281
- Matutes, E. & Polliack, A. (2000). Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* (1):22-47.
- Stilgenbauer S., Lichter P., Döhner H. (2000). Genetic features of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol.* (1): 48-72



#### Discussão e Conclusão

Para o estudo da leucemia linfocítica crónica B é necessário a optimização de protocolos de cultura celular com o objectivo de se obterem metafases em número suficiente e com a qualidade que permita a sua classificação e a identificação das alterações cromossómicas. Neste trabalho detectaram-se as alterações mais frequentes desta patologia e em 3 casos obteve-se informação adicional.

A técnica FISH é um complemento importante ao estudo da LLC, permitindo confirmar as anomalias cromossómicas ou identificar anomalias não detectadas pela citogenética convencional.

A importância para estes doentes da caracterização citogenética reside na identificação de doentes com alterações de mau prognóstico que implica vigilância mais apertada ou que define tratamento específico com fármacos adequados.

## Anexo XIV – Poster exposto na 40ª Conferência Europeia de Genética Humana em Barcelona (31 de Maio-13 de Junho 2008)



### Chronic lymphocytic leukemia: optimization of cytogenetic method for detection of chromosomal alterations

Rosário Pinto Leite\*, Marta Souto\*, Sandra Rebelo\*, Manuel Cunha\*\*, Marisol Guerra\*\*, Eufémia Ribeiro\*

\*Serviço de Genética, CDPN, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE, Vila Real, Portugal

\*\* Serviço de Hematologia, Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, EPE, Vila Real, Portugal

#### Introduction

B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is the most frequent adult leukemia in the Western world and affects mainly elderly individuals, although about a third of patients are less than 60 years of age at diagnosis. The disease results from slow clonal accumulation of neoplastic B-lymphoid cells with a phenotype of mature B-lymphocytes. The cytogenetic abnormalities are detected in 40-50% of cases. Several cytogenetic anomalies are described, the most frequent are the deletions. The most commonly deleted loci are located on 13q14, 11q22-q23, 17p13, and 6q21. Another important anomaly of B-CLL is trisomy of the chromosome 12.

Fluorescence in situ hybridization allows the detection of chromosomal aberrations not only in dividing cells but also in interphase nuclei, which has substantially enhanced the sensitivity of cytogenetic analysis in detecting frequent chromosomal aberrations. Conventional metaphase cytogenetics is employed only in few laboratories due to technical limitations, such as the typically low mitotic activity of this type of cell and their relatively poor response to mitogens, making classic cytogenetic studies often unsuccessful.

In this paper, we describe a method for efficient metaphase generation to:

- create an optimized protocol for further applications

#### Material and Methods

We analyzed 15 peripheral blood samples of Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro. We tried several protocols:

- Culture with TPA (phorbol 12-myristate 13-acetate)
- Culture with Pokeweed (lectin from *Phytolacca Americana*)
- Culture with Pha-M (phytohaemagglutinin-M; lectin from *Phaseolus vulgaris*)
- Culture without any mitogen

Table 1 – Mitogen's concentrations used to stimulate peripheral blood samples of B-CLL patients

Table	A	A'	B	C	C'	D	E	F
Mitogen	TPA	TPA	Phw	Phw	Phw	Pha-M	Pha-M	Pha-M
Volume	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	200 µl	200 µl

We have tested several concentrations of the mitogens and different times of culture and of exposition with colcemid. The culture medium was always the same. The harvesting was lab routine. GTL and CBG banding were applied.

#### Results

In the 15 samples employed in this study we obtained analyzable metaphases in every protocol we used.

When no mitogen was applied, we could never obtain metaphases.

The best results were with the stimulator phytohaemagglutinin-M (specially in tubes E and F) (fig.3), either in quantity of metaphases, neither in their quality. Otherwise, with pokeweed (fig.1) the chromosomes were shorter and metaphases had weak resolution.

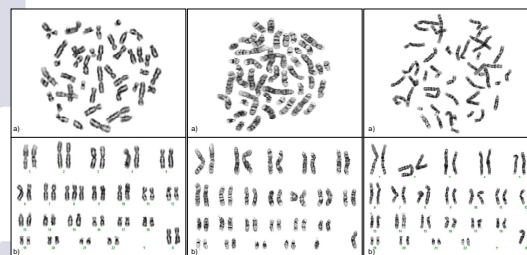


Figure 1 - Metaphase (a) and karyogram (b) obtained with pokeweed

Figure 2 - Metaphase (a) and karyogram (b) obtained with TPA

Figure 3 - Metaphase (a) and karyogram (b) obtained with Pha-M

#### Discussion and Conclusion

Applying different kinds of mitogens it was possible to obtain analyzable metaphases.

In this project, we used two mitogens specific to B lymphocytes: pokeweed and TPA. The results with TPA (fig.2) were greater, since the number of metaphases was high and the chromosomes had better resolution.

With phytohaemagglutinin M, a mitogen which stimulates either B neither T lymphocytes, we obtained the most positive results in number and quality of metaphases obtained. Since the patients with LLC have, predominantly, B lymphocytes we think the results obtained aren't forged.

Nowadays, the protocol we use to the study of the LLC's patients include the mitogens TPA and phytohaemagglutinin M.

#### References

1. Nishikawa et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
2. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
3. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
4. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
5. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
6. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
7. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
8. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
9. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.
10. Basso et al. (2003). Chromosome genetic abnormalities in CLL: a study on 88 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 21(15), 3500-3506.